

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA FONSECA DE SOUZA

EXPLORANDO A ASSOCIAÇÃO ENTRE ANOMALIAS DENTÁRIAS E
POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM CRIANÇAS COM FISSURAS LABIOPALATINAS
NÃO-SINDRÔMICAS: UM ESTUDO TRANSVERSAL COM
GRUPO DE COMPARAÇÃO

CURITIBA

2025

GABRIELA FONSECA DE SOUZA

EXPLORANDO A ASSOCIAÇÃO ENTRE ANOMALIAS DENTÁRIAS E
POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM CRIANÇAS COM FISSURAS LABIOPALATINAS
NÃO-SINDRÔMICAS: UM ESTUDO TRANSVERSAL COM
GRUPO DE COMPARAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutora em
Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Feltrin de Souza
Caparroz

Coorientadora: Profa. Dra. Erika Calvano Küchler

CURITIBA

2025

Souza, Gabriela Fonseca de

Explorando a associação entre anomalias dentárias e polimorfismos genéticos em crianças com fissuras labiopalatinas não-sindrômicas [recurso eletrônico]: um estudo transversal com grupo de comparação / Gabriela Fonseca de Saouza. – Curitiba, 2025.

1 recurso online : PDF

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2025.

Orientador: Profa. Dra. Juliana Feltrin de Souza Caparroz
Coorientador: Profa. Dra. Erika Calvano Kuchler

1. Fenda labial. 2. Fissura palatina. 3. Anomalias dentárias. 4. Polimorfismo genético. I. Caparroz, Juliana Feltrin de Souza. II. Kuchler, Erika Calvano.
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 617.522



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA -
40001016065P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GABRIELA FONSECA DE SOUZA**, intitulada: **EXPLORANDO A ASSOCIAÇÃO ENTRE ANOMALIAS DENTÁRIAS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM CRIANÇAS COM FISSURAS LABIOPALATINAS NÃO-SINDRÔMICAS: UM ESTUDO TRANSVERSAL COM GRUPO DE COMPARAÇÃO**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA FELTRIN DE SOUZA CAPARROZ, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 13 de Agosto de 2025.

Assinatura Eletrônica

19/08/2025 09:28:55.0

JULIANA FELTRIN DE SOUZA CAPARROZ

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

15/08/2025 23:53:53.0

RENATO ASSIS MACHADO

Avaliador Externo (FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS)

Assinatura Eletrônica

22/08/2025 11:00:43.0

JOAO ARMANDO BRANCHER

Avaliador Externo (DEPTO DE ANATOMIA - UFPR)

Assinatura Eletrônica

21/08/2025 12:48:28.0

JOSÉ MIGUEL AMENÁBAR CÉSPEDES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Av. Pref. Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4134 - E-mail: posodonto@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 473561

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 473561

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades e pelas pessoas que colocou em meu caminho. Por segurar a minha mão nos momentos difíceis e guiar os meus passos com sabedoria.

Aos meus pais, Ademir e Roseli, meus maiores exemplos de amor, generosidade e dedicação. Obrigada por me ensinarem que o conhecimento é um bem que ninguém pode nos tirar e por sempre acreditarem nos meus sonhos, mesmo quando isso exigiu renúncias pessoais.

Ao meu irmão, Gabriel, pelo companheirismo, carinho e apoio constantes ao longo dessa caminhada.

Ao meu namorado, Gil, por estar sempre ao meu lado com paciência, incentivo e amor. Obrigada por sempre estar ao meu lado, por acreditar em mim e por ser meu porto seguro, mesmo quando eu estava longe.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Juliana Feltrin de Souza, carinhosamente chamada de “Prof. Ju”, minha principal mentora nos últimos oito anos. Sou profundamente grata por todos os ensinamentos – acadêmicos e de vida –, pela paciência, confiança e constante incentivo para que eu me tornasse uma pesquisadora e uma pessoa melhor.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Erika Kückler, que viabilizou a realização do meu doutorado sanduíche na Alemanha, sendo uma mentora e amiga, e me oferecendo apoio fundamental ao longo dessa experiência.

Aos meus professores, em especial à Prof.^a Dr.^a Luciana Reichert Assunção Zanon, ao Prof. Dr. Fabian Calixto Fraiz e ao Prof. Dr. José Vitor Nogara Borges de Menezes, da Odontopediatria, por tantos ensinamentos e por me inspirarem não apenas a ser uma profissional melhor, mas também a construir valores mais humanos.

À minha dupla de pesquisa, Vitória Somma Tessari, cuja parceria, amizade e dedicação foram essenciais ao longo desses anos. A sua presença tornou o caminho mais leve e o trabalho mais forte.

Aos professores Dr. Christian Kishneck e Prof. Dr. Peter Proff, por gentilmente abrirem as portas das Universidades de Regensburg e Bonn, na Alemanha.

À equipe da Universidade de Bonn, especialmente Jana Marciniak e Inka BayMüller, pelo suporte técnico e atenção durante as análises laboratoriais.

Aos Professores Dr. João Armando Brancher, Dr. Renato Assis Machado e Dr. Valter Antonio Baura, pelos valiosos ensinamentos e pela generosa disposição em compartilhar seus conhecimentos sobre genética.

Ao Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Labiopalatal (CAIF), por permitir a realização da pesquisa com tanto profissionalismo e sensibilidade, e à Prof.^a Dr.^a Rafaela Scariot, pelo apoio essencial na viabilização do estudo.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), minha segunda casa nos últimos dez anos, por proporcionar uma formação de excelência, e ao ensino público de qualidade, que transforma vidas e constrói um país mais justo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPR, em especial aos coordenadores Prof. Dr. Bruno Cavenago e Prof.^a Dr.^a Juliana Feltrin, pelo suporte contínuo ao longo da pós-graduação.

À CAPES, pelo apoio financeiro ao doutorado e ao período de doutorado sanduíche, e à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFPR, pelo suporte para a execução da pesquisa.

A cada criança e família que participou deste estudo, meu sincero agradecimento. Sem vocês, esta pesquisa não seria possível.

RESUMO

As fissuras labiais e/ou palatinas (FL/P) são as anomalias congênitas mais comuns da região craniofacial, dentre os tipos, as fissuras labiais (FL) e labiopalatinas (FLP), por terem origem embrionária semelhante, podem ser agrupadas sob a denominação de fissura labial com ou sem envolvimento de palato (FL±P). Nos casos de fissuras não sindrômicas (FL/PNS), observa-se frequentemente a presença de anomalias dentárias associadas, localizadas tanto dentro quanto fora da área do defeito da fissura. Dentre essas anomalias, destacam-se os defeitos de desenvolvimento do esmalte (DDE), a agenesia dentária (AD) e alterações na cronologia de formação dentária (idade dentária – ID). Sugere-se que a coexistência de FL/PNS e anomalias dentárias esteja relacionada a fatores genéticos comuns no desenvolvimento craniofacial e dentário. Diante do exposto, o objetivo deste estudo transversal com grupo de comparação foi avaliar a associação entre anomalias dentárias, considerando DDE, AD e ID, e polimorfismos genéticos em pacientes com FL/PNS, por meio de quatro estudos. O primeiro estudo investigou a associação entre FL±PNS e DDEs, incluindo hipomineralização molar-incisivo (HMI) e hipomineralização dos segundos molares decíduos (HSMD). Foram incluídas 164 crianças com FL±PNS e 328 controles, com idade média de $8,09 \pm 1,39$ anos. A prevalência de DDE foi significativamente maior nas crianças com FL±PNS (76,8%) em comparação ao grupo controle (66,2%) ($p < 0,01$). Hipoplasia, opacidades demarcadas e HMI/HSMD foram mais frequentes no grupo com FL±PNS ($p < 0,01$), sendo a HMI o DDE mais prevalente nesse grupo (29,3%). A fluorose foi significativamente mais comum no grupo controle ($p < 0,01$). DDEs em dentes anteriores foram significativamente associados à lateralidade da fissura, sendo mais comuns nas fissuras bilaterais ($p < 0,01$). O segundo estudo avaliou a associação entre FL±PNS, HMI/HSMD e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes relacionados à homeostase do cálcio. Foram analisados os SNPs rs1544410, rs7975232, rs2228570 (*VDR*); rs927650 (*CYP24A1*); rs6256, rs307247, rs694 (*PTH*) e rs1801197 (*CALCR*) em 230 crianças, sendo 142 com FL±PNS e 105 sem. A prevalência de HMI/HSMD não foi significativamente maior no grupo com FL±PNS (44,8%) do que no grupo controle (37,1%). Nenhum dos SNPs avaliados apresentou associação significativa com HMI/HSMD ou FL±PNS na análise multivariada ($p > 0,05$). No entanto, interações entre rs1801197 (*CALCR*) e rs927650 (*CYP24A1*), e entre rs307247 (*PTH*) e rs927650 (*CYP24A1*) foram significativamente associadas à presença de FL±PNS (valor de p permutado = 0,009 e 0,04, respectivamente). A interação entre rs6256 (*PTH*) e rs1801197 (*CALCR*) foi significativamente associada à presença simultânea de FL±PNS e HMI/HSMD (valor de p permutado = 0,007). O terceiro estudo analisou a associação entre FL±PNS, AD e polimorfismos em genes codificadores de fatores de crescimento. Foram incluídas 243 crianças – 127 com FL±PNS (idade média = $8,80 \pm 2,14$ anos) e 116 sem FL±PNS (idade média = $8,58 \pm 2,03$ anos). A frequência de AD foi maior no grupo com FL±PNS (23,8%) do que no grupo controle (6,2%) ($p < 0,01$). O polimorfismo rs2237051 no gene *EGF* foi significativamente associado à presença de FL±PNS, independentemente das demais variáveis (RPa = 1,41; $p = 0,042$). Em relação à AD, apenas a presença da fissura foi associada a uma maior prevalência da condição, independentemente das demais variáveis analisadas (RPa = 3,70; $p = 0,001$). Não foram observadas associações entre a AD e os polimorfismos genéticos investigados. Quando considerada a ocorrência conjunta de AD e FL±PNS, observou-se uma associação limítrofe com o polimorfismo rs1800470 no gene *TGFB1* ($p = 0,06$). O quarto estudo teve como objetivo comparar a ID entre crianças com e sem FL±PNS e verificar a associação com polimorfismos genéticos em genes codificadores de fatores de crescimento. Foram avaliadas 209 crianças (100 com FL±PNS e 109 sem FL±PNS), com média de idade cronológica de 8,66 anos (DP = 1,92). A ID foi estimada segundo o método de Demirjian (1973), e as análises foram realizadas por examinadores calibrados ($\kappa > 0,80$).

O grupo com FL±PNS apresentou ID significativamente atrasada (média = -0,23; DP = 0,71) em comparação ao grupo controle (média = -0,01; DP = 0,88) ($p = 0,049$). O SNP rs4803455 no gene *TGFB1* foi significativamente associado à variação da ID nas crianças sem FL±PNS ($p < 0,01$). No grupo com FL±PNS, não foram observadas diferenças significativas na ID entre os genótipos. Em conjunto, os resultados deste trabalho indicam que crianças com FL±PNS apresentam maior frequência de DDEs, AD e atraso na ID. Além disso, interações entre polimorfismos genéticos estiveram associadas a alguns desses fenótipos, mesmo na ausência de associações isoladas. Especificamente, observou-se que interações entre os SNPs rs1801197 (*CALCR*) e rs927650 (*CYP24A1*), bem como entre rs307247 (*PTH*) e rs927650 (*CYP24A1*), estiveram associadas à presença de FL±PNS, enquanto a interação entre rs6256 (*PTH*) e rs1801197 (*CALCR*) foi associada à presença simultânea de FL±PNS e HMI/HSMD. O polimorfismo rs2237051 no gene *EGF* foi associado à presença de FL±PNS, e o polimorfismo rs4803455 no gene *TGFB1* foi associado à variação da ID em crianças sem FL±PNS. Esses achados reforçam a hipótese de uma base genética compartilhada entre as alterações craniofaciais e dentárias, destacando a relevância de abordagens integradas que considerem fatores genéticos e morfológicos no acompanhamento clínico de indivíduos com FL/PNS.

Palavras-chave: fenda labial; fissura palatina; anormalidades dentárias; polimorfismo genético.

ABSTRACT

Cleft lip and/or palate (CL/P) are the most common congenital anomalies of the craniofacial region. Among the subtypes, cleft lip (CL) and cleft lip and palate (CLP), due to their similar embryonic origin, may be grouped under the term cleft lip with or without cleft palate (CL±P). In nonsyndromic cases (NSCL/P), dental anomalies are frequently observed, located both within and outside the cleft area. Among these anomalies, developmental defects of enamel (DDE), tooth agenesis (TA), and changes in tooth formation chronology (dental age – DA) are noteworthy. The coexistence of NSCL/P and dental anomalies is suggested to be related to shared genetic factors in craniofacial and dental development. In this context, the aim of this cross-sectional study with a comparison group was to evaluate the association between dental anomalies (DDE, TA, and DA) and genetic polymorphisms in individuals with NSCL/P through four studies. The first study investigated the association between NSCL±P and DDEs, including molar-incisor hypomineralization (MIH) and hypomineralization of second primary molars (HSPM). A total of 164 children with NSCL±P and 328 controls were included, with a mean age of 8.09 ± 1.39 years. DDE prevalence was significantly higher in children with NSCL±P (76.8%) compared to controls (66.2%) ($p < 0.01$). Hypoplasia, demarcated opacities, and MIH/HSPM were more frequent in the NSCL±P group ($p < 0.01$), with MIH being the most prevalent DDE (29.3%). Fluorosis was significantly more common in the control group ($p < 0.01$). Anterior tooth DDEs were significantly associated with cleft laterality, being more common in bilateral clefts ($p < 0.01$). The second study evaluated the association between NSCL±P, MIH/HSPM, and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes related to calcium homeostasis. SNPs rs1544410, rs7975232, rs2228570 (*VDR*); rs927650 (*CYP24A1*); rs6256, rs307247, rs694 (*PTH*); and rs1801197 (*CALCR*) were analyzed in 230 children, 142 with NSCL±P and 105 without. The prevalence of MIH/HSPM was not significantly higher in the NSCL±P group (44.8%) than in the control group (37.1%). None of the evaluated SNPs showed a significant association with MIH/HSPM or NSCL±P in multivariate analysis ($p > 0.05$). However, interactions between rs1801197 (*CALCR*) and rs927650 (*CYP24A1*), and between rs307247 (*PTH*) and rs927650 (*CYP24A1*) were significantly associated with NSCL±P (permuted $p = 0.009$ and 0.04 , respectively). The interaction between rs6256 (*PTH*) and rs1801197 (*CALCR*) was significantly associated with the simultaneous presence of NSCL±P and MIH/HSPM (permuted $p = 0.007$). The third study analyzed the association between NSCL±P, TA, and polymorphisms in growth factors encoding genes. A total of 243 children were included – 127 with NSCL±P (mean age = 8.80 ± 2.14 years) and 116 without NSCL±P (mean age = 8.58 ± 2.03 years). TA frequency was higher in the NSCL±P group (23.8%) than in the control group (6.2%) ($p < 0.01$). The rs2237051 polymorphism in the *EGF* gene was significantly associated with NSCL±P, independently of other variables ($PR_a = 1.41$; $p = 0.042$). Regarding TA, only cleft presence was associated with greater prevalence of the condition, independently of other variables ($PR_a = 3.70$; $p = 0.001$). No associations were observed between TA and the investigated polymorphisms. When considering the combined occurrence of TA and NSCL±P, a borderline association with the rs1800470 polymorphism in the *TGFB1* gene was observed ($p = 0.06$). The fourth study aimed to compare DA between children with and without NSCL±P and verify the association with polymorphisms in growth factors encoding genes. A total of 209 children were evaluated (100 with NSCL±P and 109 without), with a mean chronological age of 8.66 years ($SD = 1.92$). DA was estimated using the Demirjian method, and analyses were performed by calibrated examiners ($kappa > 0.80$). The NSCL±P group had significantly delayed DA (mean = -0.23 ; $SD = 0.71$) compared to the control group (mean = -0.01 ; $SD = 0.88$) ($p = 0.049$). The SNP rs4803455 in the *TGFB1* gene was significantly associated with DA variation in children without NSCL±P ($p < 0.01$). No

significant differences in DA among genotypes were observed in the NSCL±P group. Overall, the results indicate that children with NSCL±P present higher frequency of DDEs, tooth agenesis, and delayed dental age. Moreover, interactions between genetic polymorphisms were associated with some of these phenotypes, even in the absence of isolated associations. Specifically, interactions between rs1801197 (*CALCR*) and rs927650 (*CYP24A1*), and between rs307247 (*PTH*) and rs927650 (*CYP24A1*), were associated with NSCL±P, while the interaction between rs6256 (*PTH*) and rs1801197 (*CALCR*) was associated with the simultaneous presence of NSCL±P and MIH/HSPM. The rs2237051 polymorphism in the *EGF* gene was associated with NSCL±P, and the rs4803455 polymorphism in the *TGFB1* gene was associated with DA variation in children without NSCL±P. These findings support the hypothesis of a shared genetic background between craniofacial and dental alterations, highlighting the importance of integrated approaches that consider both genetic and morphological factors in the clinical management of individuals with NSCL/P.

Keywords: cleft lip; cleft palate; tooth abnormalities; polymorphism, genetic.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 – Classificação das fissuras labiais e/ou palatinas	20
FIGURA 2 – Casos de anomalias dentárias associadas às FL/PNS	22

ARTIGO 1

FIGURA 1 – Seleção da amostra do estudo	41
FIGURA 2 – Frequência de indivíduos com DDE de acordo com os dentes afetados	43

ARTIGO 2

FIGURA 1 – Rede de interação entre os genes <i>PTH</i> , <i>CALCR</i> e <i>CYP24A1</i>	68
--	----

ARTIGO 3

FIGURA 1 – Seleção dos participantes do estudo	87
--	----

ARTIGO 4

FIGURA 1 – Seleção dos participantes do estudo	108
--	-----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1 – Características da amostra	42
TABELA 2 – Associação entre DDE e FL/P	44
TABELA 3 – Severidade da HMI e HSMD entre os grupos	45
TABELA 4 – Associação entre o lado da fissura e a presença de DDE (hipoplasia e opacidades demarcadas) em dentes anteriores superiores	46
TABELA SUPLEMENTAR 1 – Associação entre DDE e os tipos de fissura	53

ARTIGO 2

TABELA 1 – Características dos genes e SNPs selecionados	60
TABELA 2 – Razão de prevalência HMI/HSMD segundo os grupos e os genótipos dos genes associados ao metabolismo da vitamina D (n=230)	63
TABELA 3 – Interações SNP-SNP entre <i>VDR</i> , <i>CYP24A1</i> , <i>CALCR</i> e <i>PTH</i> avaliadas por meio do teste <i>model-based multifactor dimensionality reduction</i> (mbmdr).....	65
TABELA SUPLEMENTAR 1 – Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW)	74
TABELA SUPLEMENTAR 2 – Características da amostra	74
TABELA SUPLEMENTAR 3 – Associação entre HMI/HSMD e o grupo	74
TABELA SUPLEMENTAR 4 – Razão de prevalência de FL±PNS segundo o sexo e os genótipos dos genes associados ao metabolismo da vitamina	76

ARTIGO 3

TABELA 1 – Características dos genes selecionados para o estudo	85
TABELA 2 – Características da população de estudo de acordo com os grupos (Curitiba, Paraná, Brazil, n=243, 2024)	88
TABELA 3 – Razão de prevalência de FL±PNS segundo as características da amostra e os genótipos dos genes codificadores de fatores de crescimento (Curitiba, Paraná, Brasil, n=217, 2024)	89
TABELA 4 – Razão de prevalência de AD segundo as características da amostra e os genótipos dos genes codificadores de fatores de crescimento (Curitiba, Paraná, Brasil, n=217, 2024)	91

ARTIGO 4

TABELA 1 – Correlação entre a IC e ID de acordo com o grupo (n=209)	105
TABELA 2 – Características dos genes e polimorfismos selecionados	107
TABELA 3 – Comparação da IC, ID e delta de acordo com o grupo (n=209)	109
TABELA 4 – Comparação das variações na ID de acordo com o fenótipo e o genótipo por meio do teste ANOVA de dois fatores (n = 198)	110
TABELA SUPLEMENTAR 1 – Distribuição da frequência observada dos genótipos e equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos genéticos avaliados (n=198)	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2° PMS – Segundo Pré-Molar Superior

2° PMI – Segundo Pré-Molar Inferior

AD – Agenesia dentária

CAIF – Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Labiopalatal

CALCR – Receptor da calcitonina (*Calcitonin Receptor*)

CYP24A1 – Família 24 do citocromo P450, subfamília A, membro 1 (*Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1*)

DDE – Defeito de desenvolvimento do esmalte

DP – Desvio padrão

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)

EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

EHW – Equilíbrio de Hardy Weinberg

FL – Fissura labial

FLA – Fissura labial com envolvimento do processo alveolar

FL/P – Fissura labial e/ou palatina

FL±P – Fissura labial com ou sem envolvimento de palato

FLP – Fissura labiopalatina

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

FL±PNS – Fissura labial com ou sem envolvimento de palato não-sindrômica

FP – Fissura palatina

HMI – Hipomineralização molar-incisivo

HSMD – Hipomineralização de segundos molares decíduos

IC – Idade cronológica

IC 95% – Intervalo de confiança de 95%

ID – Idade dentária

ILS – Incisivo Lateral Superior

MAF – Frequência do alelo menor (*Minor allele Frequency*)

OR – *Odds ratio*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PTH – Paratormônio

RP – Razão de prevalência

RP_a – Razão de prevalência ajustada

RP_c – Razão de prevalência bruta

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*)

STREGA – *Strengthening the Reporting of Genetic Association Study Statement Checklist*

STROBE – *Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology*

TGFB1 – Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (*Transforming Growth Factor Beta 1*)

TGFBR2 – Receptor do Fator de Crescimento Transformador Beta 2 (*Transforming Growth Factor Beta Receptor 2*)

UFPR – Universidade Federal do Paraná

VDR – Receptor da Vitamina D (*Vitamin D Receptor*)

VIU – Vida intrauterina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 FISSURAS LABIAIS E/OU PALATINAS NÃO SINDRÔMICAS	19
2.2 ANOMALIAS DENTÁRIAS ASSOCIADAS ÀS FISSURAS LABIAIS E/OU PALATINAS NÃO SINDRÔMICAS.....	21
2.2.1 Defeitos de Desenvolvimento do Esmalte (DDEs)	24
2.2.2 Agenesia dentária (AD).....	25
2.2.3 Idade dentária (ID).....	27
2.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO E CRANIOFACIAL.....	27
3 PROBLEMA DE PESQUISA.....	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GERAL	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5 ARTIGOS.....	34
5.1 ARTIGO 1	34
5.2 ARTIGO 2	54
5.3 ARTIGO 3	78
5.4 ARTIGO 4	99
6 CONCLUSÃO.....	118
REFERÊNCIAS.....	119
APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	128
APÊNDICE 2 - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	130
APÊNDICE 3 - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE CÉLULAS DA MUCOSA ORAL	132
ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – UFPR	137
ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ/HOSPITAL DO TRABALHADOR.....	139

ANEXO 3 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA SECRETARIA MUNICIPAL DA SAÚDE DE CURITIBA.....	141
ANEXO 4 - CRITÉRIO CLÍNICO PARA CLASSIFICAÇÃO DOS DEFEITOS DE DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE (DDE), SEGUNDO GHANIM ET AL., 2015.	143
ANEXO 5 - CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DA IDADE DENTÁRIA PROPOSTO POR DERMIRJIAN ET AL. (1973)	144

1 INTRODUÇÃO

As fissuras labiais e/ou palatinas (FL/P) constituem as anomalias congênitas mais frequentes da região craniofacial, com prevalência global estimada entre um caso a cada 1.000 a 1.500 nascimentos (Salari *et al.*, 2022). Essas malformações são classicamente categorizadas em três grupos principais: fissura labial (FL), fissura palatina (FP) e fissura labiopalatina (FLP). Considerando suas origens embriológicas distintas das FP, as FL e FLP são frequentemente agrupadas sob a designação de fissura labial com ou sem envolvimento do palato (FL±P) (Martinelli *et al.*, 2020). Além da classificação quanto aos tecidos afetados, FL/P também são subdivididas conforme a lateralidade, podendo ser unilaterais ou bilaterais. Do ponto de vista etiológico, as fissuras podem ser classificadas como sindrômicas, quando associadas a outras anomalias estruturais ou cognitivas, ou não-sindrômicas (FL/PNS), quando ocorrem de forma isolada, sem associação com síndromes reconhecíveis – sendo esta última forma a mais prevalente (Mossey *et al.*, 2009).

Assim como as FL/P, as anomalias do desenvolvimento dentário também representam alterações comuns na região craniofacial. Essas anomalias podem ser classificadas em numéricas, morfológicas, estruturais, de tamanho ou de erupção (De La Dure-Molla *et al.*, 2019). Indivíduos com FL/PNS apresentam maior frequência de anomalias dentárias em comparação àqueles sem fissura, incluindo agenesia dentária (AD), dentes supranumerários, defeitos de desenvolvimento do esmalte (DDE), microdontia, taurodontismo (Fonseca-Souza *et al.*, 2022), além de atraso na idade dentária (ID) (Van Dyck *et al.*, 2019).

A coexistência entre FL/PNS e anomalias dentárias pode estar relacionada tanto a fatores locais quanto a fatores genéticos, conforme apontado na literatura (Chu *et al.*, 2016; Farias *et al.*, 2023; Hovorakova *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2016; Phan *et al.*, 2016). Dentre os fatores locais, destacam-se eventos traumáticos, principalmente os múltiplos procedimentos cirúrgicos aos quais esses indivíduos são submetidos ao longo da vida. Esses procedimentos geralmente implicam o uso de anestesia geral, manipulação direta dos tecidos bucais, além de alterações no fluxo sanguíneo local e processos inflamatórios, os quais podem impactar negativamente a formação e a mineralização dos dentes em desenvolvimento (Farias *et al.*, 2023). Ademais, o próprio defeito da fissura pode estar associado a anomalias dentárias, especialmente nos dentes anteriores superiores. Isso se deve ao fato de que os processos nasais mediais e maxilares – responsáveis pela formação do lábio superior e do rebordo alveolar – também fornecem os tecidos envolvidos na formação desses dentes (Hovorakova *et al.*, 2018).

Assim, falhas na fusão desses processos podem constituir um fator local relevante para o surgimento de anomalias dentárias.

Em relação aos fatores genéticos envolvidos na etiologia das FL/PNS e anomalias dentárias, há evidências de que a associação entre essas condições pode estar relacionada à atuação de genes pleiotrópicos. A pleiotropia é definida como o fenômeno em que um único *locus* genético afeta dois ou mais traços fenotípicos distintos (Stearns, 2010). No contexto do desenvolvimento craniofacial e dentário, diversos genes com ação pleiotrópica têm sido associados à coocorrência de FL/P e anomalias dentárias, principalmente anomalias de ordem numérica, como agenesia e dentes supranumerários (Chu *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2016; Phan *et al.*, 2016). Visando explorar essa associação como uma ferramenta adicional para elucidar o envolvimento genético na etiologia das FL/PNS, subfenótipos de fissuras baseados na presença concomitante de anomalias dentárias têm sido propostos (Germec Cakan *et al.*, 2018; Howe *et al.*, 2015; Konstantonis *et al.*, 2022; Kückler *et al.*, 2011). A caracterização desses subfenótipos pode contribuir significativamente para o avanço da compreensão dos mecanismos genéticos subjacentes às fissuras orofaciais, permitindo uma abordagem mais precisa e individualizada nos estudos genéticos e no acompanhamento clínico.

Considerando a complexidade das alterações dentárias em pacientes com FL/PNS, torna-se evidente o impacto funcional, estético e psicossocial dessas condições sobre os indivíduos afetados. Dentre as consequências mais relevantes, destacam-se prejuízos à mastigação, fala, autoestima e qualidade de vida relacionada à saúde bucal (De Oliveira Júnior *et al.*, 2023). Pacientes com anomalias craniofaciais requerem acompanhamento odontológico contínuo, tanto em razão das características próprias da condição quanto como parte integrante do tratamento multidisciplinar (American Academy of Dentistry, 2024). Nesse contexto, é fundamental que os profissionais compreendam as alterações bucais associadas às FL/PNS, de modo a viabilizar abordagens terapêuticas eficazes, bem como oferecer orientação adequada aos pacientes e seus familiares.

Para além da relevância clínica, a investigação das anomalias dentárias associadas às FL/PNS constitui um recurso adicional para aprofundar a compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento craniofacial e dentário, processos estes intimamente relacionados do ponto de vista temporal e anatômico durante a embriogênese. Até o momento, a maioria das pesquisas tem se concentrado na avaliação da AD, enquanto outras condições relevantes, como os DDEs, incluindo a hipomineralização molar-incisivo (HMI), permanecem pouco investigadas, apesar de sua natureza multifatorial e complexa. Ademais, alterações no

ritmo de desenvolvimento dentário, como variações na ID, também podem refletir interferências genéticas relevantes e ainda carecem de estudos mais aprofundados nesse grupo específico. Considerando que tais anomalias compartilham janelas temporais e vias biológicas com os processos de formação das fissuras, a avaliação ampliada desses fenótipos pode oferecer informações valiosas sobre os mecanismos etiológicos comuns. Diante dessa lacuna, justifica-se a realização do presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

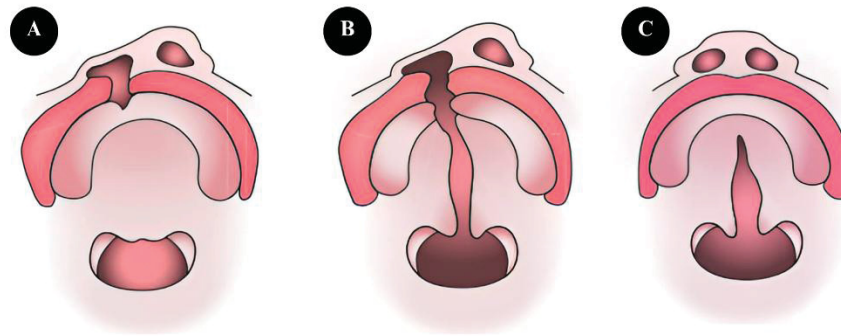
2.1 FISSURAS LABIAIS E/OU PALATINAS NÃO SINDRÔMICAS

A formação do lábio e do palato é resultado de uma série de processos embriológicos altamente coordenados, que envolvem a migração, proliferação e fusão de estruturas derivadas de células da crista neural (Nanci, 2019a). O lábio superior e o palato primário originam-se da fusão dos processos nasais mediais com os processos maxilares, os quais se dirigem à linha média e se unem por volta da sexta semana de vida intrauterina (VIU) (Hammond; Dixon, 2022; Katchburian; Arana, 2023a). O palato secundário, por sua vez, desenvolve-se a partir da fusão medial dos processos palatinos da maxila. Entre a sétima e a oitava semana de VIU, esses processos inicialmente se projetam verticalmente, posicionados posteriormente ao palato primário e lateralmente à língua em desenvolvimento. Com a progressão do crescimento craniofacial e o rebaixamento da língua, os processos palatinos reorientam-se para a posição horizontal, permitindo a fusão entre si, com o palato primário e com o septo nasal (Martinelli *et al.*, 2020; Katchburian; Arana, 2023a).

Falhas na fusão entre o processo maxilar e o processo nasal lateral podem levar à formação da FL (Figura 1A). Quando há comprometimento do lábio e da maxila, as mudanças no desenvolvimento facial podem impedir que os processos palatinos laterais se aproximem adequadamente durante seu posicionamento horizontal. Como resultado, as fissuras do palato primário são frequentemente acompanhadas por fissuras do palato secundário – estrutura embrionária que dará origem aos palatos duro e mole – caracterizando as FLP (Figura 1B). Por outro lado, quando a FP ocorre isoladamente (Figura 1C), sem associação com fissura labial, os mecanismos envolvidos parecem ser distintos. Essas fissuras podem resultar da ausência de crescimento adequado dos processos palatinos ou de falhas na sua elevação, o que compromete o contato com o septo nasal. Também podem decorrer da falta de adesão entre os processos

palatinos e o septo devido à não reabsorção do epitélio que recobre essas estruturas. Em outros casos, a ruptura do palato após fusão inicial ou falhas na integração e consolidação do mesênquima subjacente podem comprometer a fusão adequada dos processos envolvidos (Nanci, 2019a).

FIGURA 1 – Classificação das fissuras labiais e/ou palatinas. A. Fissura labial isolada; B. Fissura labiopalatina; C. Fissura palatina isolada.



Fonte: Adaptado de Mossey et al. (2009).

As FL/P são as malformações craniofaciais congênitas mais comuns, com prevalência global estimada entre 1 a cada 1.000 – 1.500 nascimentos. Quando analisadas por tipo, estima-se uma prevalência de aproximadamente 3/10.000 nascidos vivos para FL, 3,3/10.000 para FP e 4,5/10.000 para FLP (Salari et al., 2022). No Brasil, a prevalência dessas malformações é de 6,73/10.000 nascidos vivos, sendo 1,90/10.000 para FL, 2,79/10.000 para FP e 2,04/10.000 para FLP (Vieira *et al.*, 2025).

Diversas classificações foram propostas ao longo dos anos para categorizar as FL/PNS, com base em critérios anatômicos, embriológicos e clínicos (Allori *et al.*, 2017). No Brasil, é comumente utilizada a classificação proposta por Spina (1973), que tem como referência anatômica o forame incisivo. De acordo com esse sistema, as FL/P são subdivididas em: pré-forame, transforame, pós-forame e fissuras faciais raras. As fissuras pré-forame envolvem graus variados de fissura labial e/ou do processo alveolar. As fissuras transforame afetam simultaneamente o lábio e o palato, atravessando o forame incisivo. Já as fissuras pós-forame comprometem exclusivamente o palato, posterior ao forame. As fissuras faciais raras englobam formas menos frequentes, como as fissuras oblíquas (oro-orbitárias), transversais (oro-auriculares), do lábio inferior e outras variantes incomuns (Spina, 1973). Na literatura internacional, entretanto, predomina uma classificação mais simplificada, baseada na morfologia clínica e na embriologia, que agrupa as FL/PNS em três categorias principais: FL,

FLP e FP (Mossey; Catilla, 2003). Essas fissuras podem se apresentar de forma unilateral ou bilateral, variando em extensão e complexidade.

Além de serem classificadas com base em aspectos anatômicos e embriológicos, as FL/P também podem ser categorizadas etiologicamente em síndrômicas e não-síndrômicas. As FL/P síndrômicas estão associadas a desordens genéticas bem definidas, incluindo síndromes mendelianas e cromossômicas, como a síndrome de Van der Woude, síndrome de DiGeorge e a sequência de Pierre Robin (Babai; Irving, 2023), representando aproximadamente 30% dos casos totais de FL/P. Por outro lado, os casos não síndrômicos – denominados assim pela ausência aparente de outras anomalias estruturais ou cognitivas associadas – correspondem à maioria dos casos de FL/P (Leslie, 2022). Essas formas não síndrômicas apresentam etiologia multifatorial e poligênica, resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais (Beames; Lipinski, 2020). Entre os fatores ambientais descritos na literatura, destacam-se o consumo materno de álcool e tabaco, o estresse durante a gestação, a idade materna avançada e a deficiência de ácido fólico (Bezerra *et al.*, 2015; Fell *et al.*, 2022; Herkrath *et al.*, 2012; Talal Alsharif; Abdullah Alamoudi; Jafar Sabbagh, 2023).

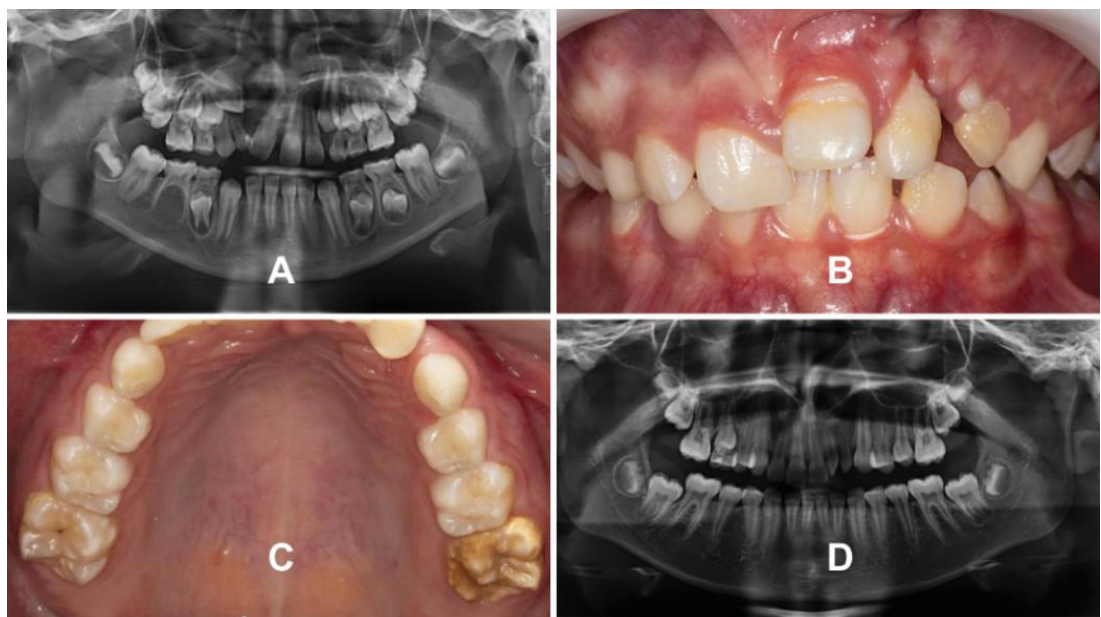
Em relação aos fatores genéticos, diversas regiões cromossômicas e genes têm sido implicados na patogênese das FL/PNS. Dentre os mais frequentemente relatados, destacam-se os genes *MSX1* (Phan *et al.*, 2016), *IRF6* (Assis Machado *et al.*, 2018; Golshan-Tafti *et al.*, 2024; Machado *et al.*, 2025) e *BMP4* (Alade; Awotoye; Butali, 2022; Assis Machado *et al.*, 2018), os quais desempenham papéis centrais na regulação do desenvolvimento craniofacial durante a embriogênese.

2.2 ANOMALIAS DENTÁRIAS ASSOCIADAS ÀS FISSURAS LABIAIS E/OU PALATINAS NÃO SINDRÔMICAS

Grande parte dos eventos críticos envolvidos na formação dos lábios e dos palatos primário e secundário ocorre de forma concomitante ao início da odontogênese. Por volta da quinta semana de VIU, o epitélio oral primitivo inicia um processo proliferativo que dá origem à banda epitelial primária. Essa estrutura se subdivide nas lâminas vestibular e dentária, sendo esta última responsável pelo desenvolvimento dos dentes. Após sua proliferação inicial, a lâmina dentária passa a apresentar zonas de atividade mitótica diferenciada e, a partir da oitava semana de VIU, inicia-se a formação dos germes dentários decíduos, caracterizando o estágio de botão. Na sequência, ocorrem os estágios subsequentes da odontogênese – fase de capuz, campânula, coroa e raiz (Katchburian; Arana, 2023b).

A sequência de desenvolvimento é essencialmente a mesma para dentes decíduos e permanentes. No caso dos dentes permanentes que possuem predecessores decíduos, o desenvolvimento se dá a partir de uma proliferação epitelial localizada na face palatina ou lingual do germe decíduo, conhecida como broto do permanente, cuja formação ocorre enquanto o dente decíduo encontra-se na fase de capuz. Por outro lado, os molares permanentes, que não possuem antecessores, se desenvolvem diretamente a partir da lâmina dentária original, a qual se estende posteriormente no arco dentário. Assim, embora compartilhem o mesmo padrão de desenvolvimento, os dentes das dentições decídua e permanente se formam em períodos distintos. O início de formação da dentição decídua ocorre entre a sexta e a oitava semana do desenvolvimento embrionário; enquanto os dentes permanentes sucessores são iniciados entre a vigésima semana de gestação e os dez meses de vida pós-natal, de acordo com os grupos dentários, sendo que os molares permanentes iniciam seu desenvolvimento entre a vigésima semana intrauterina (primeiro molar) e aproximadamente os cinco anos de idade (terceiro molar). Distúrbios em qualquer uma dessas fases podem comprometer o desenvolvimento dentário, resultando em diversas anomalias dentárias (Nanci, 2019b) (Figura 2).

FIGURA 2 – Casos de anomalias dentárias associadas às FL/PNS. A. Agenesia dos dentes 12 e 45; B. Hipoplasia do esmalte no elemento 21; C. Hipomineralização nos elementos 16 e 26; D. Dente supranumário entre os elementos 21 e 22.



Fonte: Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Labiopalatal (CAIF), Curitiba, PR.

Indivíduos com FL/PNS apresentam maior frequência de anomalias dentárias comparados àqueles sem fissura, englobando DDE, AD, dentes supranumerários, microdontia, taurodontismo (Fonseca-Souza *et al.*, 2022), e atraso da ID (Van Dyck *et al.*, 2019).

As anomalias dentárias em indivíduos com FL/PNS são observadas tanto dentro quanto fora da área da fissura (De Stefani *et al.*, 2019; Mangione *et al.*, 2018). Sugere-se que as anomalias localizadas dentro da área da fissura estão relacionadas a fatores locais, como traumas cirúrgicos durante intervenções primárias, bem como ao suprimento sanguíneo reduzido associado ao defeito da fissura (Korolenkova; Starikova; Udalova, 2019). Quanto às alterações dentárias observadas além da área da fissura, levanta-se a hipótese de que genes pleiotrópicos, isto é, genes cuja atividade é capaz de gerar mais de um fenótipo (Ittisoponpisan *et al.*, 2017) estão envolvidos no desenvolvimento tanto da FL/PNS quanto das anomalias dentárias.

Estudos prévios reforçam tal hipótese: Kuchler *et al.* (2021), encontraram uma associação significante entre polimorfismos genéticos em *BMP2* e *SMAD6* e AD (Kuchler *et al.*, 2021), enquanto Kan *et al.* (2019) observaram que o polimorfismo rs4791774 em *NTN1* foi associado à presença de dentes supranumerários (Kan *et al.*, 2019). Reporta-se ainda na literatura genes associados a coexistência de AD e FL/P, incluindo *MSX1*, *PAX9*, *IRF6*, *TP63*, *KMT2D*, *KDM6A*, *SATB2*, *TBX22*, *TGFA*, *TGFβ3*, *TGFBR1*, *TGFBR2*, *FGF8*, *FGFR1*, *KISS1R*, *WNT3*, *WNT5A*, *CDH1*, *CHD7*, *AXIN2*, *TWIST1*, *BCOR*, *OFD1*, *PTCH1*, *PITX2* e *PVRL1* (Phan *et al.*, 2016).

Apesar dos avanços na identificação de genes relacionados às anomalias dentárias em indivíduos com FL/PNS, a maioria dos estudos genéticos ainda se concentra exclusivamente na AD, havendo escassez de investigações voltadas a outras alterações dentárias frequentemente observadas nessa população. A alta prevalência dessas alterações ressalta a importância de estudos abrangentes que caracterizem não apenas a agenesia, mas também demais distúrbios do desenvolvimento dentário. A análise detalhada dessas condições, aliada à investigação dos fatores genéticos associados, pode permitir a identificação de padrões fenotípicos e genéticos específicos, contribuindo para abordagens diagnósticas, preventivas e terapêuticas mais eficazes. Ao reconhecer precocemente indivíduos com maior risco para anomalias dentárias relacionadas às fissuras, é possível planejar intervenções odontológicas mais individualizadas, favorecendo melhores desfechos funcionais, estéticos e psicossociais ao longo do desenvolvimento craniofacial.

2.2.1 Defeitos de Desenvolvimento do Esmalte (DDEs)

Os DDEs resultam de distúrbios durante a formação da matriz do esmalte ou durante sua mineralização. Esses defeitos são classificados em dois grandes subtipos: defeitos quantitativos, caracterizados por uma quantidade reduzida de esmalte formado, denominados hipoplasia do esmalte; e defeitos qualitativos, nos quais a espessura do esmalte é preservada, mas há alteração na sua composição mineral, sendo denominados hipomineralizações ou opacidades (Ghanim *et al.*, 2015).

As hipomineralizações podem ser subdivididas clinicamente em dois padrões principais, opacidades difusas e demarcadas. As opacidades difusas, também denominadas fluorose dentária, apresentam-se com um padrão mosqueado ou linhas verticais na superfície do esmalte, com margens indefinidas, estando frequentemente associadas à exposição sistêmica ao flúor. As opacidades demarcadas, por sua vez, possuem coloração variável (branca/creme a amarela/marrom), limites bem definidos e contraste com o esmalte adjacente. Dentre essas últimas, destacam-se a Hipomineralização de Molares e Incisivos (HMI), que afeta pelo menos um primeiro molar permanente, podendo ou não comprometer os incisivos, e a Hipomineralização dos Segundos Molares Decíduos (HSMD), que acomete molares decíduos. Há ainda o grupo das hipomineralizações não-HMI/HSMD, que incluem defeitos demarcados semelhantes, mas presentes em dentes que não se enquadram nos critérios clínicos desses subtipos (Ghanim *et al.*, 2015).

A etiologia dos DDEs é considerada multifatorial, envolvendo fatores ambientais, locais, sistêmicos e genéticos (Lopes-Fatturi *et al.*, 2024). A hipoplasia do esmalte e as hipomineralizações não-HMI/HSMD são comumente associadas a eventos traumáticos locais, que podem causar injúrias diretas aos germes dentários durante o desenvolvimento (Farias *et al.*, 2023). Por outro lado, a HMI e a HSMD têm sido descritas como condições de origem complexa, nas quais estão envolvidos fatores sistêmicos e genéticos. Entre as exposições sistêmicas associadas, destacam-se doenças infecciosas na infância, episódios febris, uso prolongado de antibióticos, desordens nutricionais e complicações neonatais (Feltrin-Souza *et al.*, 2024).

Como esperado, indivíduos com FL/PNS possuem maior prevalência de DDEs, apresentando até três vezes mais chances de desenvolver tais defeitos em comparação àqueles sem fissura (Fonseca-Souza *et al.*, 2022). A frequência de hipoplasia e de opacidades demarcadas não-HMI/HSMD varia entre 20,7% e 50,7% na literatura (Farias *et al.*, 2023; Ruiz *et al.*, 2013), sendo essas alterações mais comumente observadas nos dentes anteriores

superiores permanentes (Lavôr *et al.*, 2020). Esses achados sugerem uma possível associação com fatores locais, especialmente relacionados às cirurgias corretivas precoces, que frequentemente envolvem anestesia geral, uso de medicamentos, manipulação dos tecidos orais e alterações no suprimento sanguíneo, fatores que podem interferir nos processos de amelogênese (Farias *et al.*, 2023).

Já defeitos de origem complexa, como a HMI e a HSMD, são poucos os estudos que os relacionam à FL/PNS. Os trabalhos existentes também reportam alta prevalência desses defeitos entre indivíduos com FL/PNS, variando de 52,1% a 67,8% (Farias *et al.*, 2023; Wanderley Lacerda *et al.*, 2024). Essa associação pode estar relacionada à maior exposição desses pacientes a fatores sistêmicos associados ao desenvolvimento desses DDEs, como infecções respiratórias, otite média, hospitalizações e uso frequente de antibióticos (Azman; Manuel, 2020; Laager *et al.*, 2024). Além disso, polimorfismos genéticos nos genes *ENAM* e *AMELX*, previamente associados à HMI (Lopes-Fatturi *et al.*, 2025), também têm sido implicados na etiologia das fissuras labiopalatinas (Oliveira *et al.*, 2014; 2024), sugerindo uma base genética comum entre essas condições, possivelmente associada a um efeito pleiotrópico desses genes.

Do ponto de vista clínico, os DDEs – especialmente a HMI e a HSMD – trazem impactos significativos para a saúde bucal, incluindo aumento da suscetibilidade à cárie dentária (Americano *et al.*, 2017), hipersensibilidade (Santos *et al.*, 2024), fraturas pós-eruptivas do esmalte (Jorge; Reis; Soviero, 2024), dificuldade no controle da dor e necessidade precoce de intervenções restauradoras (Mendonça *et al.*, 2024), impactando negativamente na qualidade de vida dos indivíduos afetados (Jälevik; Sabel; Robertson, 2022). Esses efeitos são potencialmente agravados em pacientes com FL/PNS, cuja condição implica em maiores desafios odontológicos, funcionais e psicossociais.

2.2.2 Agenesia dentária (AD)

Assim como as FL/P, a AD representa uma das anomalias de desenvolvimento mais comuns entre seres humanos, sendo a coocorrência desses defeitos reportada tanto em humanos, quanto em animais (Phan *et al.*, 2016). A AD é caracterizada pela ausência do desenvolvimento de um ou mais dentes, podendo variar desde a falta de um único elemento dentário até a ausência completa da dentes. Essa condição é classificada de acordo com o número de dentes ausentes: hipodontia, quando há ausência de um a cinco dentes; oligodontia, quando seis ou

mais dentes não se desenvolvem; e anodontia, quando todos os dentes estão ausentes (Meade; Dreyer, 2023).

Na população em geral, a prevalência estimada de AD é de 6,4% (Khalaf *et al.*, 2014), porém, este número varia consideravelmente entre diferentes populações, sendo de 4,4% na América do Norte e de 13,4% na África (Meade; Dreyer, 2023). Em indivíduos com FL/PNS a prevalência de agenesia é ainda maior, uma revisão sistemática da literatura com metanálise, reportou que esses indivíduos possuem uma chance quase 20 vezes maior de apresentar AD do que indivíduos não afetados, com prevalência variando entre 13,1% e 77,3% (Fonseca-Souza *et al.*, 2022).

Indivíduos com FL/PNS podem apresentar AD tanto na região diretamente afetada pela fissura quanto em áreas distantes dessa anomalia. Na área da fissura, o dente cuja ausência é mais frequentemente relatada é o incisivo lateral (Bartzela *et al.*, 2013; Mangione *et al.*, 2018). Nessa localização, a própria presença da fissura, associada a possíveis traumas cirúrgicos, pode interferir na integridade do tecido mesenquimal e na vascularização local, elementos essenciais para o desenvolvimento dentário (Korolenkova; Starikova; Udalova, 2019). Já em regiões não afetadas pela fissura, a agenesia costuma envolver, com maior frequência, os segundos pré-molares (Küchler *et al.*, 2011; Sá *et al.*, 2016). A manifestação da AD em locais distantes da fissura reforça a hipótese de que anomalias dentárias e fissuras craniofaciais podem compartilhar determinantes genéticos comuns (Phan *et al.*, 2016).

Mais de 26 genes foram associados simultaneamente à presença de FL/P e à AD, incluindo *MSX1*, *PAX9*, *IRF6*, *TP63*, *BMP2*, *BMP4*, *WNT10A*, *WNT3* e *AXIN2*, todos envolvidos em vias que participam do desenvolvimento craniofacial e orofacial (Fan *et al.*, 2019; Howe *et al.*, 2022; Phan *et al.*, 2016). Porém, é importante pontuar que nem todos os estudos avaliam separadamente os casos de agenesia que ocorrem dentro e fora da área da fissura, o que pode comprometer a interpretação dos resultados que associam essa alteração dentária à fatores genéticos.

A AD pode gerar impactos funcionais significativos, comprometendo a oclusão, a estética e a fonética. Nesse contexto, o estudo de sua ocorrência em indivíduos com FL/P é essencial para o planejamento de abordagens terapêuticas interdisciplinares mais eficazes. Além disso, compreender os mecanismos responsáveis pela coocorrência entre essas condições pode contribuir para o avanço no entendimento dos processos biológicos subjacentes ao seu desenvolvimento, os quais ainda não são completamente elucidados.

2.2.3 Idade dentária (ID)

A ID é um marcador biológico útil para a avaliação do estágio de crescimento infantil, com aplicações na prática clínica odontológica e na área forense (Küchler *et al.*, 2022). Durante a infância, pacientes com FL/PNS necessitam de diversas intervenções na região craniofacial, incluindo procedimentos ortodônticos e cirúrgicos (Mundra; Lowe; Khechoyan, 2022). Nesses casos, o estágio de maturação é um importante indicador para determinar o momento mais adequado para os tratamentos e obter melhores desfechos (Mundra; Lowe; Khechoyan, 2022). Assim, a ID pode ser uma ferramenta inicial para estimar o estágio de crescimento infantil (Barreto *et al.*, 2022).

Em crianças com FL/PNS, estudos sugerem que há um atraso na ID em comparação aos indivíduos não afetados. Uma revisão sistemática identificou essa tendência de retardo no desenvolvimento dentário em pacientes com fissura (Van Dyck *et al.*, 2019). Embora os mecanismos ainda não estejam completamente elucidados, esse atraso pode estar relacionado a fatores genéticos subjacentes às fissuras ou a fatores locais e sistêmicos (Park *et al.*, 2023; Torlińska-Walkowiak *et al.*, 2021).

Alguns estudos têm investigado o papel de polimorfismos genéticos na variação da ID na população em geral. Küchler *et al.* (2022) e Madalena *et al.* (2025) analisaram variantes em genes relacionados ao metabolismo da vitamina D, não encontrando associações significativas com a ID. Da mesma forma, Madalena *et al.* (2023) avaliou polimorfismos em genes que codificam receptores de estrogênio, também sem identificar associação. No entanto, a literatura ainda carece de estudos que explorem essa possível relação na população de indivíduos com fissuras orais.

2.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DENTÁRIO E CRANIOFACIAL

Variações na sequência do DNA que ocorrem com frequência na população são denominadas polimorfismos. Dentre eles, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*) constituem o tipo mais comum no genoma humano, caracterizando-se por uma alteração em uma única base nitrogenada e estando presentes em pelo menos 1% da população (Karki *et al.*, 2015).

Os SNPs podem ocorrer tanto em regiões codificantes quanto não codificantes do genoma. Quando presentes em regiões codificantes, podem resultar em alterações na sequência de aminoácidos da proteína (SNPs não sinônimos) ou não causar mudanças funcionais detectáveis (SNPs sinônimos). Além disso, SNPs localizados em regiões regulatórias ou não codificantes podem afetar a atividade de promotores, a expressão gênica, a conformação e a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA), bem como a localização subcelular de mRNAs e/ou proteínas (Shastry, 2009). Esses mecanismos podem, direta ou indiretamente, contribuir para a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças e malformações, como as FL/P e as anomalias dentárias associadas.

Além da análise do impacto isolado de polimorfismos genéticos na ocorrência de condições de origem multifatorial, as interações gênicas, conhecidas como epistasias (Motsinger; Ritchie, 2006), têm ganhado relevância crescente nas pesquisas genômicas, incluindo os estudos sobre anomalias dentárias e craniofaciais (Lara *et al.*, 2024; Machado *et al.*, 2022). Nesse contexto, o efeito de uma variante genética sobre determinado fenótipo pode ser modulado pela presença concomitante de variantes em outros genes, evidenciando a complexidade das redes genéticas envolvidas na determinação fenotípica (Motsinger; Ritchie, 2006).

Diversos polimorfismos genéticos têm sido associados a distúrbios do desenvolvimento dentário e craniofacial na população em geral, incluindo aqueles localizados em genes relacionados à homeostase mineral – gene do receptor da vitamina D (*VDR*), gene da família 24 do citocromo P450, subfamília A, membro 1 (*CYP24A1*), gene do paratormônio (*PTH*) e gene do receptor da calcitonina (*CALCR*) – (Elzein *et al.*, 2022; Gerber *et al.*, 2023; Küchler *et al.*, 2021; Lopes-Fatturi *et al.*, 2024; Nireeksha *et al.*, 2022; Sadeghi *et al.*, 2021) e à codificação de fatores de crescimento – gene do Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (*TGFB1*), gene do Receptor do Fator de Crescimento Transformador Beta 2 (*TGFBR2*), gene do Fator de Crescimento Epidérmico (*EGF*) e do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (*EGFR*) (Gerber *et al.*, 2021; Kirschneck *et al.*, 2022). Esses achados reforçam a relevância de se explorar com maior profundidade os polimorfismos genéticos que atuam em vias críticas do desenvolvimento craniofacial, especialmente em diferentes populações, como é o caso das FL/P.

2.3.1 Genes associados à homeostase mineral

O cálcio (Ca) desempenha papel essencial na formação e mineralização dos tecidos dentários, especialmente durante a amelogenese. Além dos íons cálcio (Ca^{2+}) serem necessários para o crescimento dos cristais de hidroxiapatita, participando da mineralização do esmalte, atuam também na regulação da atividade dos ameloblastos (Kim; Hong, 2018).

A homeostase do Ca é regulada por uma interação coordenada entre três hormônios: vitamina D, paratormônio, calcitonina. Para que essa regulação ocorra adequadamente, alguns genes exercem papel essencial, como os genes *VDR*, *CYP24A1*, *PTH* *CALCR* (Costanzo, 2024).

Os genes *VDR* e *CYP24A1* estão envolvidos no metabolismo da vitamina D. Esta é um pró-hormônio caracterizado por metabolismo e regulação complexos, sendo conhecida por sua atuação no metabolismo do Ca e fósforo e na manutenção da saúde óssea. Entretanto, estudos têm atribuído à vitamina D diversas funções extraesqueléticas, como a regulação da proliferação celular em determinadas vias oncogênicas, além de efeitos antioxidantes e imunomoduladores (Voltan *et al.*, 2023). A vitamina D atua na regulação dos níveis de Ca no organismo por meio de três mecanismos principais: aumento da absorção intestinal de Ca, mobilização de Ca dos ossos e reabsorção de Ca pelos rins (Bikle, 2021). A maioria de seus efeitos é mediada pelos receptores de vitamina D (VDR), que regulam a expressão de muitos genes-alvo. O VDR está presente em quase todos os tipos celulares humanos e modulam a transcrição de aproximadamente 3% dos genes humanos (Voltan *et al.*, 2023). Enquanto o VDR atua em associação com a forma ativa da vitamina D, o *CYP24A1* é responsável por seu catabolismo. Esta enzima mitocondrial converte a vitamina D em um metabólito inativo, limitando a quantidade de sua forma ativa nos tecidos (Voltan *et al.*, 2023).

O gene *PTH* é responsável pela codificação do paratormônio, um hormônio essencial na regulação do metabolismo do Ca. A secreção do paratormônio pelas glândulas paratireoides é estimulada pela diminuição da concentração plasmática de Ca^{2+} . Uma vez liberado, o hormônio atua em tecidos-alvo como os ossos, rins e intestino, promovendo ações coordenadas que aumentam e normalizam os níveis de Ca^{2+} no plasma. O gene *CALCR*, por sua vez, codifica o receptor da calcitonina. A liberação da calcitonina ocorre em resposta ao aumento da concentração plasmática de Ca^{2+} , sendo sua principal ação a inibição da reabsorção óssea mediada por osteoclastos, o que contribui para a redução dos níveis de Ca circulante (Costanzo, 2024).

A literatura indica que os genes *VDR*, *CYP24A1*, *PTH* e *CALCR* apresentam funções durante a formação dentária. Estudos em modelos animais mostram que o *VDR* é expresso em ameloblastos, controlando sua diferenciação, além de regular a expressão de genes

fundamentais do esmalte, como a amelogenina (Berdal *et al.*, 1995; Houari *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2009). O *CYP24A1* parece estar presente em células da polpa dentária humana e em células do folículo dentário, além de participar da mineralização dos tecidos duros dentários (Khanna-Jain *et al.*, 2010). O *PTH*, participa da formação da dentina, atuando sobre os odontoblastos (Guimarães *et al.*, 2014; Sakakura *et al.*, 1989), e parece exercer papel no transporte de cálcio durante a amelogênese (Bawden; Deaton; Crenshaw, 1983). Por fim, o *CALCR* é possivelmente expresso na papila dentária dos germes dentários em desenvolvimento (Sakakura *et al.*, 1989).

Algumas condições dentárias têm sido associadas a polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo do Ca. No gene *VDR*, os polimorfismos rs10735810 e rs2228570 foram associados à suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões de cárie (Nireeksha *et al.*, 2022; Sadeghi *et al.*, 2021). Ainda no gene *VDR*, os polimorfismos rs739837 e rs78783628 foram associados a uma maior prevalência de HMI e HSMD, defeito caracterizado por uma deficiência na mineralização do esmalte dentário (Elzein *et al.*, 2022; Fatturi *et al.*, 2020; Lopes-Fatturi *et al.*, 2024). Além disso, os polimorfismos rs694 e rs307247 em *PTH* têm sido relacionados a variações no tamanho da coroa dentária (Gerber *et al.*, 2023).

Além do papel desempenhado pelo *VDR*, *CYP24A1*, *PTH* e *CALCR* no desenvolvimento dentário, tem sido levantada a hipótese de uma possível participação desses genes na formação de outras estruturas da face e do crânio. Essa possibilidade é sustentada, por achados que identificaram associação entre polimorfismos nos genes *VDR* e *PTH* e retrognatismo mandibular (Küchler *et al.*, 2021). No entanto, as evidências disponíveis ainda são limitadas e não permitem afirmar, de forma conclusiva, a atuação direta desses genes na morfogênese craniofacial.

2.3.2 Genes que codificam fatores de crescimento

Fatores de crescimento são moléculas bioativas que regulam diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação, migração e apoptose (Antonioli; Bublil; Yarden, 2008). Dentre esses fatores, destacam-se o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), codificado pelo gene *TGFB1*; o receptor do tipo II do TGF- β (TGF- β RII), codificado pelo gene *TGFB2*; o fator de crescimento epidérmico (EGF), codificado pelo gene *EGF*; e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), codificado pelo gene *EGFR*.

O TGF- β é uma citocina amplamente expressa que desempenha um papel essencial na regulação de diversos processos celulares, incluindo organogênese, diferenciação, crescimento

celular, hemostasia, produção de matriz extracelular e modulação da resposta imune (Krivicka; Pilmane; Akota, 2013; Massagué, 2000). A sinalização adequada do TGF- β é fundamental para a manutenção do estado fisiológico celular, e sua desregulação pode contribuir para diversas patologias (Chia *et al.*, 2024). A superfamília TGF- β compreende três isoformas principais – TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 – codificadas por genes localizados em cromossomos distintos. O gene *TGFB1* codifica a proteína TGF- β 1, e atua por meio da ligação ao TGF- β RII, regulando processos de proliferação, diferenciação e crescimento celular em múltiplos tecidos, incluindo os tecidos ósseo, epitelial e conjuntivo (Krivicka; Pilmane; Akota, 2013).

O EGF é um fator mitogênico que estimula a proliferação celular por meio de sua interação com o receptor específico EGFR. A sinalização decorrente da ligação EGF/EGFR é essencial para a regulação de diversos processos biológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, a regeneração de células-tronco e o transporte de íons em tecidos epiteliais. Devido à sua ampla atuação em mecanismos de crescimento e reparo tecidual, disfunções nessa via de sinalização têm sido associadas a distúrbios do desenvolvimento e a diversas condições patológicas (Zeng; Harris, 2014).

Estudos com modelos animais e investigações genéticas em humanos têm destacado a importância de fatores de crescimento, como o TGF- β 1 e o EGF, no desenvolvimento da região craniofacial. Esses fatores participam de processos fundamentais, como o fechamento do palato e a formação adequada da dentição (Barrio *et al.*, 2014; Iamaroon; Tait; Diewert, 1996; Ito *et al.*, 2003; Krivicka; Pilmane; Akota, 2013; Kronmiller, 1995; Miettinen *et al.*, 1999; Yapijakis *et al.*, 2023; Zhang; Qu; Zhang, 2014). No que se refere à palatogênese, o *TGFB1* e seu receptor *TGFB2* estão envolvidos em etapas cruciais, como proliferação, crescimento e fusão dos processos palatinos (Ito *et al.*, 2003; Tarr *et al.*, 2018; Yapijakis *et al.*, 2023). Esse fator também apresenta expressão durante a odontogênese, sendo expresso tanto no epitélio quanto no mesênquima, com papel regulador na proliferação celular ao longo de todo o desenvolvimento dentário (Zhang; Qu; Zhang, 2014).

De modo semelhante, os genes que codificam o EGF e EGFR são expressos durante a formação do palato e evidências experimentais demonstram que alterações na sinalização dessa via estão relacionadas a falhas na fusão dos processos palatinos (Barrio *et al.*, 2014; Miettinen *et al.*, 1999). No desenvolvimento dentário, o EGF é detectado na mandíbula antes mesmo da formação da lâmina dentária, indicando seu papel na indução desse processo (Kronmiller, 1995), além de atuar inibindo a diferenciação de células precursoras dos odontoblastos e ameloblastos (Partanen; Ekblom; Thesleff, 1985).

Embora os mecanismos funcionais desses fatores estejam bem estabelecidos, ainda são escassos os estudos que avaliam a associação entre polimorfismos em genes codificadores desses fatores de crescimento e características craniofaciais em humanos. Um estudo de Gerber *et al.* (2021) apontou associação entre variantes nos genes *TGFB1* (rs1800470) e *EGF* (rs4444903) e variações no tamanho dentário. Além disso, Kirschneck *et al.*, (2022) identificaram que o polimorfismo rs3087465, situado na região promotora do gene *TGFBR2*, está relacionado ao retrognatismo mandibular.

3 PROBLEMA DE PESQUISA

Observa-se que, embora diversos estudos apontem a participação de anomalias dentárias e de fatores genéticos no desenvolvimento craniofacial, ainda são necessários mais estudos que explorem de forma integrada esses aspectos em populações com FL/PNS. Nesse contexto, o presente estudo busca contribuir para o aprofundamento do conhecimento sobre as possíveis interações entre alterações dentárias e variantes genéticas, conforme descrito nos objetivos a seguir.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo transversal com grupo de comparação foi avaliar a associação entre anomalias dentárias, considerando DDE, AD e ID, e polimorfismos genéticos em pacientes com FL/PNS.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a associação entre DDE e FL/PNS.
- Avaliar a associação entre HMI/HSMD e polimorfismos em genes associados à homeostase mineral em crianças com e sem FL±PNS.
- Avaliar a associação entre AD e FL±PNS.
- Avaliar a associação entre AD e polimorfismos em genes que codificam fatores de crescimento em crianças com e sem FL±PNS.
- Comparar ID entre crianças com e sem FL±PNS.
- Avaliar a associação entre variações na ID e polimorfismos em genes que codificam fatores de crescimento em crianças com e sem FL±PNS.

5 ARTIGOS

5.1 ARTIGO 1

Fissura labiopalatina está associada a uma maior prevalência de hipomineralização molar-incisivo: um estudo transversal com grupo de comparação*

Gabriela Fonseca-Souza^a

Vitória Somma Tessari^a

Tatiane Zahn Cardoso Rolim^a

Luíse Gomes-Souza^a

Juliana Feltrin-Souza^a

^a Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632, Curitiba, PR, 80210-170, Brasil.

* Artigo aceito e publicado no periódico *European Archives of Paediatric Dentistry*.

Fonseca-Souza G, Tessari V, Rolim T, Gomes-Souza L, Feltrin-Souza J. Cleft lip and palate are associated with a higher prevalence of molar-incisor hypomineralisation: a cross-sectional study with a comparison group. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2025 Sep 1. doi: 10.1007/s40368-025-01105-7.

Fissura labiopalatina está associada a uma maior prevalência de hipomineralização molar-incisivo: um estudo transversal com grupo de comparação

Resumo

Objetivo: Avaliar a associação entre fissura labial e/ou palatina não sindrômica (FL/PNS) e defeitos de desenvolvimento do esmalte (DDE), incluindo os subtipos de DDE, como hipomineralização molar-incisivo (HMI) e hipomineralização dos segundos molares decíduos (HSMD).

Métodos: Este estudo transversal com grupo de comparação incluiu indivíduos com e sem FL/PNS – denominados “grupo FL/PNS” e “grupo controle”, respectivamente. O grupo FL/PNS foi recrutado em um centro especializado em anomalias craniofaciais, enquanto o grupo controle foi selecionado aleatoriamente a partir de uma amostra populacional de escolares, na proporção de 1:2. Os DDEs foram avaliados por examinadores calibrados, por meio de exame clínico. A associação entre FL/PNS e DDE foi analisada utilizando-se modelo de regressão de Poisson univariada com variância robusta ($\alpha = 5\%$).

Resultados: A amostra incluiu 164 crianças com FL/PNS e 328 controles (idade média = 8,09 $\pm$ 1,39 anos). Os DDEs foram mais prevalentes no grupo FL/PNS (76,8%) do que no grupo controle (66,2%) ($p < 0,01$). Hipoplasia, opacidades demarcadas e HMI/HSMD foram significativamente mais frequentes no grupo FL/PNS ($p < 0,01$). A fluorose foi significativamente mais prevalente no grupo controle ($p < 0,01$). A HMI foi o DDE mais frequente no grupo FL/PNS (29,3%). Os DDEs em dentes anteriores foram significativamente associados à lateralidade da fissura, sendo mais comuns nas fissuras bilaterais ($p < 0,01$).

Conclusão: Crianças com FL/PNS apresentam maior prevalência de DDE do que aquelas sem FL/PNS, especialmente HMI.

Palavras-chave: Fenda labial; Fissura palatina; Defeitos de desenvolvimento do esmalte dentário; Hipomineralização molar; Hipomineralização do esmalte dentário; Hipoplasia do esmalte dentário.

Introdução

A fissura labial e/ou palatina (FL/P) é uma condição congênita complexa, influenciada por fatores genéticos e ambientais. Essa anomalia é classificada em três tipos principais: fissura labial isolada (FL), fissura labial e palatina (FLP) e fissura palatina isolada (FP) (Salari et al., 2022). A prevalência global dessas alterações é estimada em aproximadamente 3 a cada 10.000 nascidos vivos para FL, 3,3/10.000 para FP e 4,5/10.000 para FLP (Salari et al., 2022). A FL/P pode ser classificada em formas síndrômicas e não síndrômicas. A forma não síndrômica (FL/PNS) ocorre como defeito isolado, sem a presença de outras anomalias congênitas, sendo a apresentação mais comum. Em contraste, a forma síndrômica está associada a síndromes genéticas e a outras anomalias estruturais ou do desenvolvimento, correspondendo a cerca de 15% dos casos (Mossey & Modell, 2012).

Indivíduos com FL/PNS apresentam maior risco de apresentarem anomalias dentárias, incluindo alterações no número de dentes, variações morfológicas e defeitos de desenvolvimento do esmalte (DDEs) (Fonseca-Souza et al., 2025; 2022). Uma revisão sistemática prévia indicou que indivíduos com fissuras apresentam três vezes mais chances de desenvolver DDE em comparação àqueles sem a anomalia (Fonseca-Souza et al., 2022). Os DDEs são definidos como alterações do esmalte dentário, decorrentes de distúrbios na amelogenese. Clinicamente, os DDEs manifestam-se por alterações na espessura ou na translucidez do esmalte (FDI, 1992).

Os DDEs são classificados em dois grandes subtipos: defeitos quantitativos, caracterizados pela hipoplasia do esmalte, e defeitos qualitativos, caracterizados pela hipomineralização (Manton & Vieira, 2023). A hipomineralização pode ser subclassificada em opacidades difusas ou demarcadas. As opacidades difusas apresentam padrão linear, irregular, com bordas indistintas, incluindo opacidades devido à fluorose. Em contraste, as opacidades demarcadas possuem limites bem definidos, distinguindo-se nitidamente do esmalte aparentemente saudável ao redor. Subtipos específicos de opacidades demarcadas incluem a Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI), que afeta os primeiros molares permanentes, com ou sem envolvimento dos incisivos permanentes, e a Hipomineralização de Segundos Molares Decíduos (HSMD), que acomete os segundos molares decíduos (Ghanim et al., 2015). Ambos os defeitos apresentam alterações na translucidez do esmalte, com coloração variando de branco/creme a amarelo/marrom. Em casos mais severos, pode haver fratura do esmalte pós-eruptiva, restaurações atípicas, cárie ou até mesmo extrações atípicas (Ghanim et al., 2015).

A amelogênese é influenciada por fatores locais, sistêmicos e genéticos. Considerando que indivíduos com fissuras são submetidos a intervenções cirúrgicas nos primeiros meses e anos de vida – período crítico para a formação e mineralização do esmalte – esses procedimentos podem atuar como fator de risco para os DDEs, especialmente hipoplasias e opacidades demarcadas em dentes anteriores (Wanderley Lacerda et al., 2024). Além disso, alguns tipos de DDE, como HMI e HSMD, possuem envolvimento genético em sua etiologia (Lopes-Fatturi et al., 2025). Polimorfismos genéticos envolvidos na amelogênese também têm sido associados à ocorrência de fissuras, o que pode contribuir ainda mais para a alta prevalência de DDE nessa população (Oliveira et al., 2014; 2024).

Apesar da existência de estudos que avaliam os DDE em indivíduos com FL/PNS (Carpentier et al., 2014; Kulas et al., 2016; Ruiz et al., 2013; Shen et al., 2019; Sundell et al., 2016; Wanderley Lacerda et al., 2024), muitos apresentam limitações, como ausência de grupo controle, falta de examinadores calibrados e restrição na avaliação de determinados grupos dentários. Além disso, alguns estudos não classificaram adequadamente os tipos de DDE, o que é essencial para o diagnóstico preciso e o manejo clínico adequado. Diante disso, este estudo transversal teve como objetivo avaliar a associação entre FL/PNS e DDE, incluindo os seus subtipos, como a HMI.

Métodos

Aspectos éticos

Este estudo transversal com grupo de comparação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (protocolo nº 5.100.185), pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (protocolo nº 4.095.306) e pelo Comitê de Ética da Secretaria Municipal da Saúde de Curitiba, PR. Todos os pacientes e responsáveis que participaram da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este estudo foi conduzido conforme a diretriz STROBE (Von Elm *et al.*, 2008).

Seleção da amostra

O cálculo do tamanho amostral foi baseado em dados prévios sobre a associação entre fissuras e anomalias dentárias (Fonseca-Souza et al., 2022). A prevalência estimada de

anomalias dentárias em indivíduos com fissura foi de 38,8%, considerando-se um poder estatístico de 80%, intervalo de confiança de 95% (IC95%) e razão de chances (*odds ratio* – OR) de 3,14. Para compensar possíveis perdas amostrais, o tamanho calculado da amostra foi acrescido de 20%. Dessa forma, a amostra final estimada variou de 100 a 120 crianças por grupo.

A amostra do estudo foi composta por indivíduos com e sem FL/PNS, denominados “grupo FL/PNS” e “grupo controle”, respectivamente, com idades entre 5 e 12 anos. Os participantes do grupo FL/PNS foram recrutados no Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Lábio Palatal (CAIF, Curitiba, Paraná, Brasil) e selecionados aleatoriamente conforme a ordem de chegada para o atendimento. A classificação do tipo de fissura (FL, FLP ou FP) foi realizada por exame clínico e confirmada por prontuário médico. Indivíduos com síndromes, outras anomalias craniofaciais além da fissura e aqueles com amelogênese imperfeita não foram incluídas.

O grupo controle foi selecionado aleatoriamente a partir de uma amostra populacional de escolares dos nove distritos administrativos de Curitiba (Paraná, Brasil) (n=568). Utilizou-se um método de amostragem por conglomerados em dois estágios: no primeiro, duas escolas foram sorteadas por distrito; no segundo, duas a três turmas foram aleatoriamente selecionadas em cada escola, com base na proporção de escolares por distrito. A randomização foi realizada utilizando o site www.randomizer.org. A partir dessa amostra populacional, duas crianças foram sorteadas para cada participante do grupo FL/PNS, mantendo-se uma razão de 2:1 entre os grupos controle e FL/PNS. Indivíduos com síndromes, anomalias craniofaciais e amelogênese imperfeita foram excluídos.

Calibração dos examinadores e coleta de dados

Quatro examinadoras (GFS, VST, TZCR e LGS) foram calibrados para avaliar os DDEs utilizando o método proposto por Ghanim et al. (2015) para estudos epidemiológicos sobre hipomineralização do esmalte. Esse sistema de classificação categoriza os DDE em opacidades difusas (fluorose dentária), hipoplasia, amelogênese imperfeita, opacidades demarcadas e HMI/HSMD. Adicionalmente, as lesões de HMI e HSMD são classificadas quanto à gravidade, em opacidades brancas ou creme, opacidades amarelas ou marrons, fratura pós-eruptiva do esmalte, restaurações atípicas, cárie atípica e extrações atípicas.

O processo de calibração teve início com um treinamento teórico, no qual 20 fotografias intraorais com diferentes manifestações de DDEs foram analisadas. Em seguida, os examinadores avaliaram de forma independente 30 fotografias distintas, com diferentes apresentações clínicas de DDEs. Uma semana depois, esse mesmo conjunto de imagens foi reavaliado de forma independente por cada examinadora. As avaliações foram comparadas com as de um examinador de referência. A confiabilidade das avaliações foi determinada por meio do coeficiente kappa para concordância inter e intraexaminadores, obtendo-se valores superiores a 0,80.

A presença de DDE foi avaliada por meio de exame clínico oral. Os participantes do grupo FL/PNS foram examinados em ambiente odontológico, sob iluminação artificial e com auxílio de espelho bucal, enquanto os do grupo controle foram avaliados no ambiente escolar, sob condições semelhantes. O período de recrutamento e coleta de dados ocorreu entre maio de 2021 e junho de 2024.

Análise estatística

A variável independente, FL/PNS, foi categorizada tanto por grupo (“FL/PNS” e “controle”) quanto por tipo de fissura (FL±P e FP). A categoria FL±P englobou os casos de FL e FLP, por compartilharem origem embriológica distinta da FP. A variável dependente, DDE, foi classificada como “sim” ou “não”, com base na presença de diferentes tipos de defeitos na dentição decídua e permanente, incluindo fluorose dentária, hipoplasia, opacidades demarcadas e HMI/HSMD. Os casos de HMI/HSMD foram ainda categorizados quanto à gravidade em: opacidades brancas ou creme, opacidades amarelas ou marrons, fratura pós-eruptiva do esmalte, restaurações atípicas, cárie atípica e extrações atípicas.

A associação entre FL/PNS e DDE, assim como a relação entre os diferentes tipos de FL/PNS e os DDE, foi analisada utilizando modelo de regressão de Poisson univariada com variância robusta, com estimativa da razão de prevalência (RP) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Adicionalmente, o teste U de Mann-Whitney foi utilizado para comparar o número de primeiros molares permanentes afetados por HMI entre os grupos FL/PNS e controle.

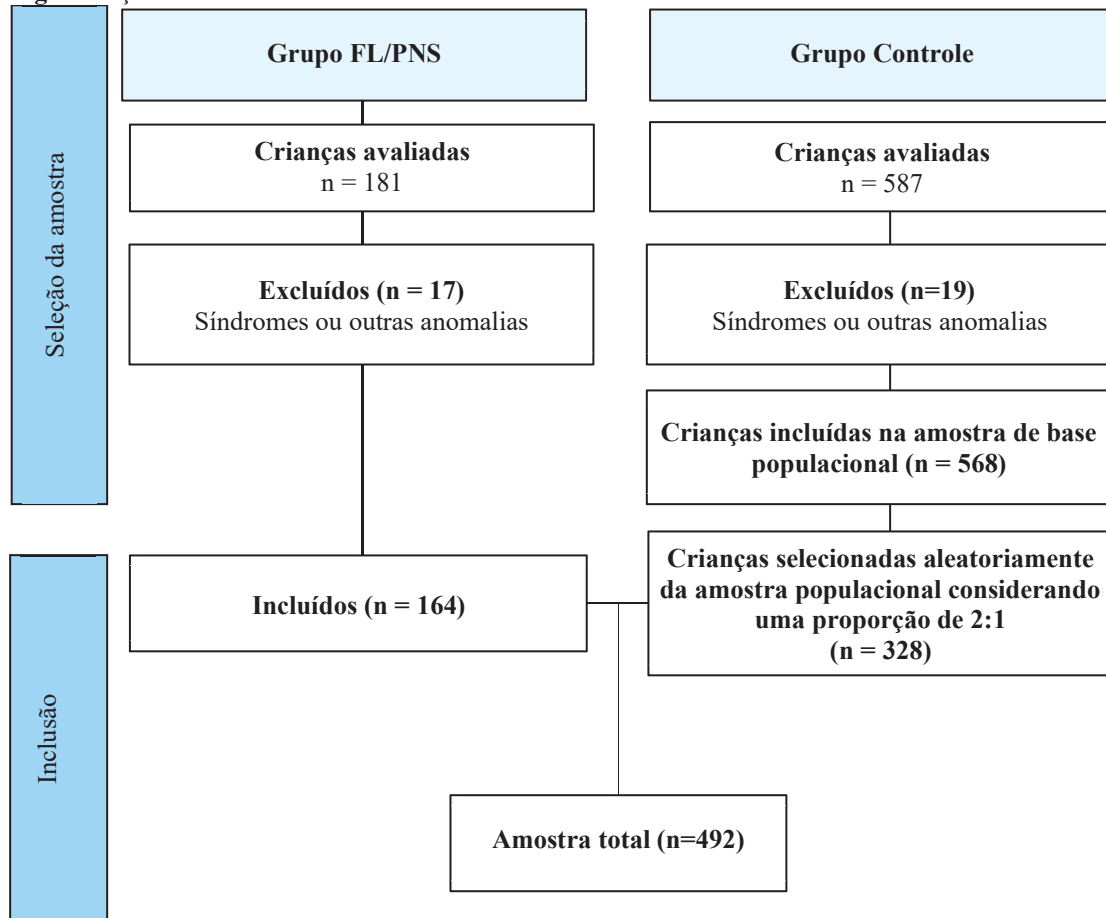
Considerando que certos tipos de DDE, como hipoplasia e opacidades demarcadas em dentes anteriores, estão associados a fatores locais – e que a presença da fissura pode influenciar o desenvolvimento dos dentes adjacentes à região fissurada –, realizou-se o teste do qui-quadrado para avaliar a associação entre o lado da fissura e a ocorrência de DDE no mesmo

lado. A análise dos dados foi realizada utilizando o *software Statistical Package for the Social Sciences* (versão 25.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), adotando-se nível de significância de 5% para todas as análises.

Resultados

Um total de 181 indivíduos foi inicialmente avaliado para inclusão no grupo com FL/PNS. Destes, 17 foram excluídos devido à presença de síndromes ou outras anomalias craniofaciais distintas da fissura, resultando em 164 participantes incluídos no grupo com FL/PNS. Para o grupo controle, 587 indivíduos foram avaliados a partir da amostra populacional. Dezenove foram excluídos devido à presença de síndromes ou outras anomalias craniofaciais, totalizando 568 participantes elegíveis. A partir dessa amostra elegível, 328 crianças foram selecionadas aleatoriamente para manter a proporção de 2:1 em relação ao grupo com FL/PNS. Assim, a amostra final do estudo foi composta por 492 participantes (Fig. 1).

Fig.1 Seleção da amostra do estudo.



Entre os participantes, 254 (51,6%) eram do sexo masculino. A idade média geral foi de 8,09 anos (DP = 1,39). No grupo FL/PNS, conforme a classificação das fissuras, 45 indivíduos (27,4%) apresentavam FL, 97 (59,1%) FLP e 22 (13,5%) FP. As características detalhadas da amostra estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 Características da amostra.

Variável	Categoria	Grupo n (%)		Total
		FL/PNS	Controle	
Sexo	Feminino	72 (30,3)	166 (69,7)	238
	Masculino	92 (36,2)	162 (63,8)	254
Classificação a fissura	FL	45 (100)	-	45
	FLP	97(100)	-	97
	FP	22 (100)	-	22
Lateralidade da fissura	Direita	32 (100)	-	32
	Esquerda	58 (100)	-	58
	Bilateral	52 (100)	-	39
Dentição	Decídua	19 (51,4)	18 (48,6)	37 (7,5)
	Mista	145 (31,9)	310 (68,1)	455 (92,5)
Idade	Média (DP)	8,71 (2,03)	7,77 (0,73)	8,09 (1,39)

Legenda: FL/P – Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica; FL – Fissura labial; FLP – Fissura labiopalatina; FP – Fissura Palatina; DP – Desvio padrão.

Um total de 343 crianças apresentou ao menos um dente acometido por algum tipo de DDE. Esses defeitos foram significativamente mais frequentes no grupo com FL/PNS (76,8%) em comparação ao grupo controle (66,2%) ($p = 0,015$). Na dentição permanente, os primeiros molares e os incisivos foram os mais acometidos pelos DDE (Fig. 2a). Na dentição decídua, os caninos, primeiros e segundos molares foram os dentes mais frequentemente afetados (Fig. 2b).

Todos os tipos de DDE avaliados, tanto na dentição permanente quanto na decídua, foram significativamente mais frequentes no grupo FL/PNS, com exceção da fluorose, que foi significativamente mais prevalente no grupo controle. Na dentição permanente, a fluorose foi observada em 21,3% dos indivíduos com FL/PNS e em 48,8% dos controles ($p < 0,001$). Um padrão semelhante foi observado na dentição decídua ($p < 0,001$). Em contrapartida, hipoplasia, opacidades demarcadas, HMI e HSMD foram significativamente mais frequentes no grupo FL/PNS ($p < 0,05$) (Tabela 2). Em relação ao tipo de fissura, nenhum dos DDEs avaliados apresentou associação significativa (Tabela Suplementar 1).

Fig. 2 Frequência de indivíduos com DDE de acordo com os dentes afetados na dentição permanente (A) e na dentição decídua (B).

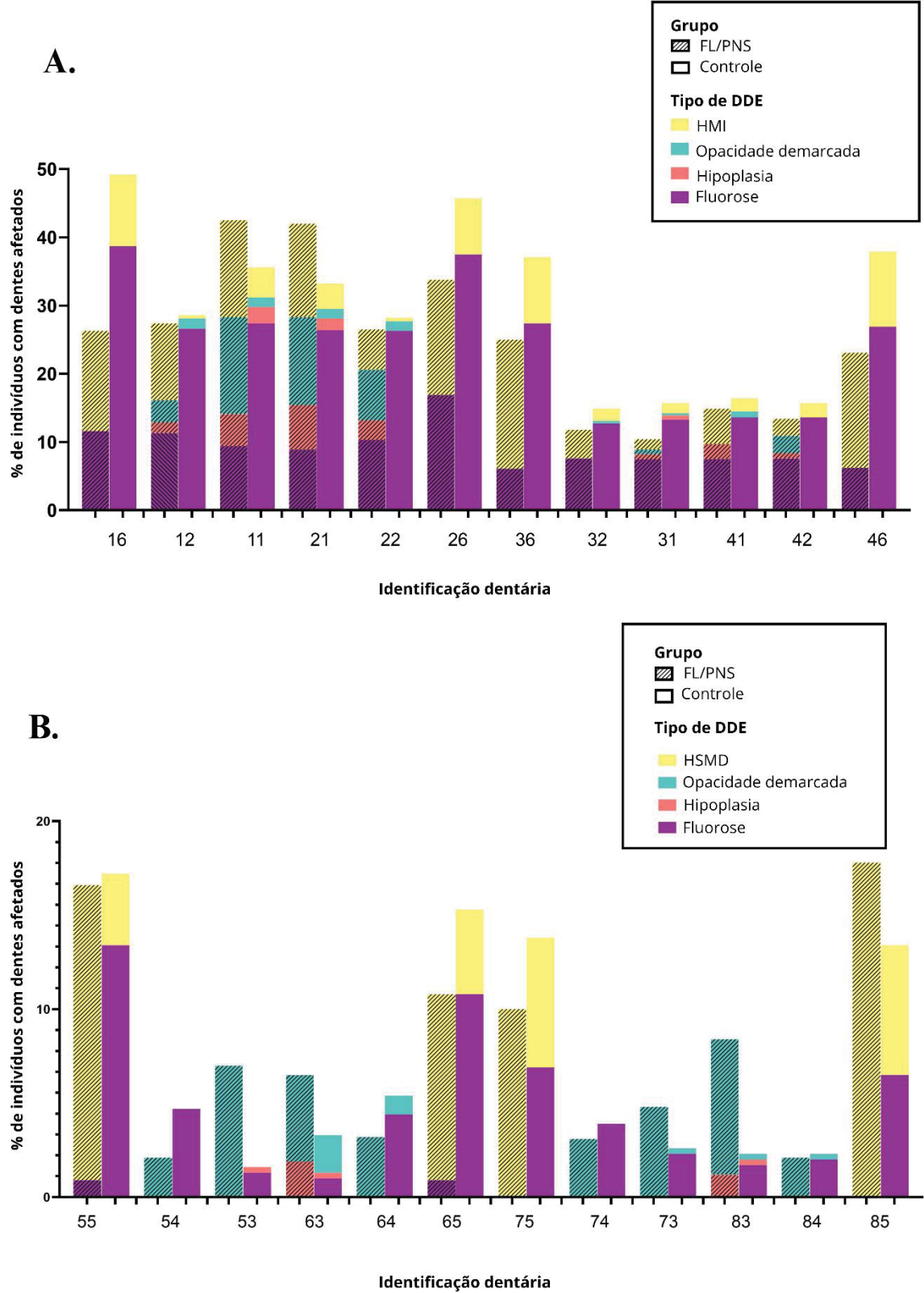


Tabela 2 Associação entre DDE e FL/P.

Grupo	Dentição Permanente				Valor de p	Dentição Decídua				
	Tipo de DDE n (%)			RP _c (IC 95%)		Tipo de DDE n (%)			RP _c (IC 95%)	Valor de p
	Fluorose		Total			Fluorose		Total		
	Sim	Não				Sim	Não			
FL/P	35 (21,3)	129 (78,7)	164	0,44 (0,32-0,60)	<0,001	2 (1,2)	162 (98,8)	164	0,07 (0,02-0,27)	<0,001
Controle	160 (48,8)	168 (51,2)	328	1		60 (18,3)	268 (81,7)	328	1	
Hipoplasia										
	Sim	Não	Total			Sim	Não	Total		
FL/P	19 (11,6)	145 (88,4)	164	3,45 (1,68-7,09)	0,001	8 (4,9)	156 (95,1)	164	8,00 (1,72-37,2)	0,008
Controle	11 (3,4)	317 (96,6)	328	1		2 (0,6)	326 (99,4)	328	1	
Opacidade Demarcada										
	Sim	Não	Total			Sim	Não	Total		
FL/P	41 (25,0)	123 (75,0)	164	4,82 (2,83-8,22)	<0,001	21 (12,8)	143 (87,2)	164	3,81 (1,89-7,73)	<0,001
Controle	17 (5,2)	311 (94,8)	328	1		11 (3,4)	317 (96,6)	328	1	
HMI										
	Sim	Não	Total			Sim	Não	Total		
FL/P	48 (29,3)	116 (70,7)	164	1,60 (1,15-2,23)	0,005	37 (22,6)	127 (77,4)	164	2,00 (1,32-3,03)	0,001
Controle	60 (18,3)	268 (81,7)	328	1		37 (11,3)	291 (88,7)	328	1	

Legenda: FL/P – Fissura labial e/ou palatina; DDE – Defeito de desenvolvimento do esmalte; HMI – Hipomineralização molar-incisivo; HSMD – Hipomineralização de segundos molares decíduos; RPc – Razão de prevalência bruta; IC 95% - Intervalo de confiança de 95%.
Negrito significa valores estatisticamente significantes.

A HMI foi o DDE mais prevalente no grupo com FL/PNS. A gravidade mais frequentemente observada da HMI foi as opacidades brancas ou creme, significativamente mais frequentes no grupo FL/PNS (23,8%) do que no grupo controle (13,4%) ($p = 0,004$). Da mesma forma, em relação à HSMD, as opacidades brancas ou creme foram mais frequentes no grupo FL/PNS (12,8%) em comparação aos controles (5,2%) ($p = 0,003$). Entre as demais classificações de gravidade da HMI, a fratura pós-eruptiva do esmalte e as restaurações atípicas foram significativamente mais comuns no grupo FL/PNS do que no grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 3). Considerando o número de primeiros molares permanentes acometidos por HMI, o teste U de Mann-Whitney indicou que o grupo FL/PNS apresenta mais dentes afetados do que o grupo controle ($p = 0,028$).

Tabela 3 Severidade da HMI e HSMD entre os grupos.

Tabela 3. Severidade da HMI e HSMD entre os grupos.								
Grupo	HMI			Valor de p	HSMD			Valor de p*
	Opacidades brancas ou creme				Opacidades brancas ou creme			
	Sim	Não	Total		Sim	Não	Total	
FL/P	39 (23,8)	125 (76,2)	164	0,004	21 (12,8)	143 (87,2)	164	0,003
Controle	44 (13,4)	284 (8,6,6)	328		17 (5,2)	311 (94,8)	328	
Opacidades amarelas ou marrons				Opacidades amarelas ou marrons				
	Sim	Não	Total		Sim	Não	Total	
FL/P	13 (7,9)	151 (92,1)	164	0,386	12 (7,3)	152 (92,7)	164	0,076
Controle	34 (10,4)	294 (89,6)	328		12 (3,7)	316 (96,3)	328	
Fratura pós-eruptiva				Fratura pós-eruptiva				
	Sim	Não	Total		Sim	Não	Total	
FL/P	8 (4,9)	156 (95,1)	164	0,029	5 (3,0)	159 (97,0)	164	0,691
Controle	5 (1,5)	323 (98,5)	328		8 (2,4)	320 (97,6)	328	
Restauração atípica				Restauração atípica				
	Sim	Não	Total		Sim	Não	Total	
FL/P	10 (6,1)	154 (93,9)	164	0,002	6 (3,7)	158 (96,3)	164	0,443
Controle	4 (1,2)	324 (98,8)	328		8 (2,4)	320 (97,6)	328	
Cárie atípica				Cárie atípica				
	Sim	Não	Total		Sim	Não	Total	
FL/P	5 (3,0)	159 (97,0)	164	0,727	6 (3,7)	158 (96,3)	164	0,443
Controle	12 (3,7)	316 (96,3)	328		8 (2,4)	320 (97,6)	328	

Legenda: FL/P – Fissura labial e/ou palatina; HMI – Hipomineralização molar-incisivo; HSMD – Hipomineralização de segundos molares decíduos.

Negrito significa valores estatisticamente significantes.

Considerando a ocorrência de hipoplasia do esmalte e opacidades demarcadas nos dentes anteriores superiores (incisivos e caninos), observou-se associação significativa entre o lado da fissura e a presença desses DDE ($p < 0,001$). Casos de fissura bilateral apresentaram maior prevalência de DDE acometendo dentes anteriores superiores de ambos os lados (direito e esquerdo) (25,0%), enquanto essa condição foi menos frequente nas fissuras do lado direito (3,1%) e ausente nas fissuras do lado esquerdo ($p < 0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4 Associação entre o lado da fissura e a presença de DDE (hipoplasia e opacidades demarcadas) em dentes anteriores superiores.

Lado da fissura	Total de pacientes com DDE apenas nos dentes anteriores superiores direitos n (%)		Valor de p	Total de pacientes com DDE apenas nos dentes anteriores superiores esquerdos n (%)		Valor de p	Total de pacientes com DDE em dentes superiores de ambos os lados n (%)		Valor de p	Total de pacientes com DDE em dentes anteriores n (%)		Valor de p*
	Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não	
Direito	4 (12,5)	28 (87,5)		0 (0,0)	32 (100)		1 (3,1)	1 (3,1)		5 (15,6)	27 (84,4)	
Esquerdo	3 (5,2)	55 (94,8)	0,455	7 (12,1)	51 (87,9)	0,074	0 (0,0)	58 (100)	<0,001	10 (17,2)	48 (82,8)	<0,001
Bilateral	5 (9,6)	47 (90,4)		8 (15,4)	44 (84,6)		13 (25,0)	39 (75,0)		26 (50,0)	26 (50,0)	

Legenda: DDE – Defeito de desenvolvimento do esmalte.
Negrito significa valores estatisticamente significantes.

Discussão

Sabe-se que pacientes com FL/PNS apresentam maior prevalência de anomalias dentárias, especialmente alterações numéricas, morfológicas e estruturais (Fonseca-Souza et al. 2022). No presente estudo, indivíduos com FL/PNS apresentaram maior prevalência de DDE em comparação ao grupo controle, com maior ocorrência de hipoplasia do esmalte, opacidades demarcadas e HMI/HSMD tanto na dentição permanente quanto na decídua. Cerca de 78% das crianças do grupo com FL/PNS apresentaram ao menos um dente acometido por DDE. Pesquisas anteriores também relataram alta prevalência desses defeitos em indivíduos com fissura, com taxas variando de 39,7% a 93,8% (Ruiz et al. 2013).

No presente estudo, a fluorose dentária foi o único tipo de DDE significativamente mais prevalente no grupo controle em relação ao grupo com FL/PNS. Essa condição, caracterizada por opacidades difusas, resulta da ingestão excessiva de flúor durante a formação dentária, sendo a água potável a principal fonte de exposição (Aoun et al. 2018). No Brasil, a concentração recomendada de flúor na água de abastecimento público varia de 0,55 a 0,84 mg/L, visando maximizar a prevenção da cárie e minimizar o risco de fluorose (Pinto et al. 2021). As crianças incluídas neste estudo são oriundas do estado do Paraná, onde aproximadamente 96% dos municípios possuem acesso à água fluoretada (Pinto et al. 2021). O grupo controle, selecionado aleatoriamente a partir de uma amostra populacional, foi composto por residentes de Curitiba, capital do Paraná, onde 88,8% do abastecimento público de água contém níveis ótimos de flúor (Pinto et al. 2024). Por outro lado, embora o grupo com FL/PNS tenha sido recrutado em um único centro especializado, seus participantes são provenientes de diferentes regiões do estado, muitas das quais apresentam concentrações de flúor abaixo do recomendado (Pinto et al. 2024). De acordo com uma revisão sistemática, em áreas com concentração de flúor entre 0,7 e 1 mg/L na água, a prevalência de fluorose, em qualquer grau de severidade, pode chegar a aproximadamente 40% (Iheozor-Ejiofor et al. 2015). Assim, as diferenças regionais na exposição ao flúor podem explicar a disparidade observada entre os grupos.

A hipoplasia do esmalte e as opacidades demarcadas não relacionadas à HMI/HSMD foram mais frequentes no grupo com FL/PNS em comparação ao grupo controle. A hipoplasia representa um defeito quantitativo, caracterizado por redução localizada na espessura do esmalte, enquanto as opacidades demarcadas são defeitos qualitativos, resultantes da hipomineralização do esmalte (Ghanim et al. 2015). Esses DDEs foram observados principalmente nos dentes anteriores superiores permanentes, em ambos os grupos, e estão

principalmente associados a fatores etiológicos locais, como eventos traumáticos. Indivíduos com fissuras orofaciais frequentemente são submetidos a múltiplos procedimentos cirúrgicos ao longo da vida. Essas intervenções envolvem anestesia geral, manejo farmacológico peri e pós-operatório, manipulação mecânica dos tecidos orais, alterações no suprimento sanguíneo local e respostas inflamatórias – todos fatores que podem simular traumas locais e interferir no processo normal de amelogênese (Farias et al. 2023). A alta frequência desses defeitos nos dentes anteriores adjacentes à fissura observada neste estudo reforça essa hipótese. Resultados semelhantes foram relatados em estudos prévios, sugerindo que a hipoplasia do esmalte e as opacidades demarcadas na região anterior estão provavelmente relacionadas a fatores locais (Farias et al. 2023; Lavôr et al. 2020; Ruiz et al. 2013).

Neste estudo, a HMI e a HSMD foram significativamente mais prevalentes no grupo com FL/PNS (29,3%) em comparação ao grupo controle (18,3%). Embora poucos estudos tenham focado especificamente nessas alterações do esmalte em indivíduos com fissura, pesquisas anteriores relataram prevalências ainda maiores, variando de 52,1% (Farias et al. 2023) a 67,8% nessa população (Wanderley Lacerda et al. 2024). No entanto, é importante destacar que esses estudos não incluíram grupos controle, o que limita a força das comparações. Diferentemente dos DDEs em dentes anteriores, cuja etiologia é principalmente local, a HMI e a HSMD possuem origem multifatorial e complexa, envolvendo fatores sistêmicos, ambientais e genéticos (Feltrin-Souza et al. 2024; Lopes-Fatturi et al. 2025).

Exposições sistêmicas durante os períodos pré, peri e pós-natal – como doenças sistêmicas, uso de antibióticos e episódios de febre alta na infância – estão associadas ao aumento do risco de HMI e HSMD (Feltrin-Souza et al. 2024; Fonseca-Souza et al. 2021; Juárez-López et al. 2023). Crianças com FL/PNS são particularmente vulneráveis a essas exposições, pois apresentam maiores taxas de hospitalização por infecções respiratórias (Laager et al. 2024), maior propensão à otite média (Azman e Manuel 2020) e risco elevado de infecções pós-operatórias após cirurgias corretivas, com uso frequente de antibióticos – fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da HMI e da HSMD. Além disso, variantes genéticas implicadas na HMI, como nos genes *ENAM* e *AMELX* (Lopes-Fatturi et al. 2025), também têm sido associadas à patogênese das fissuras labiopalatinas (Oliveira et al. 2014; Oliveira et al. 2024). A elevada frequência de HMI e HSMD em indivíduos com FL/PNS pode, portanto, ser parcialmente explicada por mecanismos patogênicos sobrepostos, já que ambas as condições são influenciadas por vias genéticas multifatoriais que regulam a amelogênese e a palatogênese (Wanderley Lacerda et al. 2024).

Embora vários estudos tenham investigado a frequência de DDE em indivíduos com FL/PNS, é necessário considerar importantes variações metodológicas entre eles. Diversos estudos carecem de grupo controle, concentram-se apenas em grupos específicos de dentes ou não diferenciam os tipos de DDE, o que limita a interpretação e a generalização dos resultados. Em contraste, o presente estudo adotou uma abordagem metodológica mais robusta, discriminando os tipos de DDE e as dentições afetadas. Um dos principais pontos fortes deste trabalho está na inclusão de um grupo controle com base populacional, com uma proporção de 2:1 em relação ao grupo FL/PNS, o que amplia a validade externa dos achados. Além disso, o uso de examinadores calibrados e a avaliação padronizada de cada tipo de DDE contribuem para a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos achados. Primeiramente, o delineamento transversal não permite estabelecer relações de causalidade entre os DDEs e a presença de FL/PNS. Além disso, a amostra foi composta por indivíduos atendidos em um único centro de referência, o que pode limitar a generalização dos resultados para outras populações. Estudos futuros devem adotar delineamentos longitudinais e incluir amostras mais abrangentes, a fim de aprimorar a compreensão da relação entre FL/PNS e DDE. A inclusão de dados sobre exposições ambientais e genéticas poderá esclarecer melhor a etiologia multifatorial dos DDEs nesta população.

Conclusão

Em conclusão, indivíduos com FL/PNS apresentaram uma prevalência significativamente maior de todos os tipos de DDE. O reconhecimento da presença desses defeitos nessa população é essencial para o diagnóstico precoce e o manejo adequado, especialmente nos casos de HMI e HSMD, que podem impactar negativamente a saúde bucal e a qualidade de vida.

Referências

- Aoun A, Darwiche F, Al Hayek S, Doumit J. The Fluoride Debate: The Pros and Cons of Fluoridation. *Prev Nutr Food Sci.* 2018;23:171-80. <https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.3.171>.
- Azman A, Manuel AM. Otological outcome in cleft lip and palate children with middle ear effusion. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2020;138:110274. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2020.110274>.

- Carpentier S, Ghijselings E, Schoenaers J, Carels C, Verdonck A. Enamel defects on the maxillary premolars in patients with cleft lip and/or palate: a retrospective case-control study. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2014;15:159-65. <https://doi.org/10.1007/s40368-013-0078-8>.
- Farias A, Rojas-Gualdrón DF, Restrepo M, Zecchin KG, Bussaneli DG, Yupanqui K, Raposo-Amaral CE, Dos Santos-Pinto L. Characterization of enamel developmental defects in patients with orofacial clefts and their relationship to surgical procedures. *Clin Oral Investig*. 2023;27:7809-20. <https://doi.org/10.1007/s00784-023-05370-y>.
- Feltrin-Souza J, Fonseca-Souza G, Pinheiro E, Fraiz FC, Cerri PS. Systemic and Environmental Risk Factors Associated with Molar Incisor Hypomineralisation. *Monogr Oral Sci*. 2024;32:117-39. <https://doi.org/10.1159/000538874>.
- Fonseca-Souza G, Alves-Souza L, de Menezes-Oliveira MAH, Daratsianos N, Beisel-Memmert S, Kirschneck C, Scariot R, Feltrin-Souza J, Kuchler EC. Polymorphisms and dental age in non-syndromic cleft lip and palate: a cross-sectional study. *BMC Pediatr*. 2025;25:80. <https://doi.org/10.1186/s12887-025-05444-8>.
- Fonseca-Souza G, de Oliveira LB, Wambier LM, Scariot R, Feltrin-Souza J. Tooth abnormalities associated with non-syndromic cleft lip and palate: systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2022;26:5089-103. <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04540-8>.
- Fonseca-Souza G, Fatturi AL, Fraiz FC, Assunção LRdS, Feltrin-Souza J. What are the systemic factors associated with the molar-incisor hypomineralization etiology? *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr*. 2021;21:e0041. <https://doi.org/10.1590/pboci.2021.130>.
- Ghanim A, Elfrink M, Weerheijm K, Mariño R, Manton D. A practical method for use in epidemiological studies on enamel hypomineralisation. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2015;16:235-46. <https://doi.org/10.1007/s40368-015-0178-8>.
- Group FW. A review of the developmental defects of enamel index (DDE Index). Commission on Oral Health, Research & Epidemiology. Report of an FDI Working Group. *Int Dent J*. 1992;42:411-26.
- Iheozor-Ejiofor Z, Worthington HV, Walsh T, O'Malley L, Clarkson JE, Macey R, Alam R, Tugwell P, Welch V, Glenny AM. Water fluoridation for the prevention of dental caries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;2015:Cd010856. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010856.pub2>.
- Juárez-López MLA, Salazar-Treto LV, Hernández-Monjaraz B, Molina-Frechero N. Etiological Factors of Molar Incisor Hypomineralization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dent J*. 2023;11. <https://doi.org/10.3390/dj11050111>.
- Kulas A, Illge C, Bekes K, Eckert AW, Fuhrmann RA, Hirsch C. Structural color changes in permanent enamel of patients with cleft lip and palate: a case-control study. *J Orofac Orthop*. 2016;77:45-51. <https://doi.org/10.1007/s00056-015-0007-z>.
- Laager R, Gregoriano C, Hauser S, Koehler H, Schuetz P, Mueller B, Kutz A. Hospitalization Trends for Airway Infections and In-Hospital Complications in Cleft Lip and Palate. *JAMA Netw Open*. 2024;7:e2428077. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2024.28077>.

- Lavôr JR, Lacerda RHW, Modesto A, Vieira AR. Maxillary incisor enamel defects in individuals born with cleft lip/palate. *PloS one*. 2020;15:e0244506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244506>.
- Lopes-Fatturi A, Fonseca-Souza G, Wambier LM, Brancher JA, Küchler EC, Feltrin-Souza J. Genetic polymorphisms associated with developmental defects of enamel: A systematic review. *Int J Paediatr Dent*. 2025;35:298-310. <https://doi.org/10.1111/ipd.13233>.
- Manton DJ, Vieira AR. Chapter 4: Development Defects of Enamel and Dentine and Coronal Caries. *Monogr Oral Sci*. 2023;31:37-49. <https://doi.org/10.1159/000530556>.
- Mossey PA, Modell B. Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. *Front Oral Biol*. 2012;16:1-18. <https://doi.org/10.1159/000337464>.
- Oliveira FV, Dionísio TJ, Neves LT, Machado MA, Santos CF, Oliveira TM. Amelogenin gene influence on enamel defects of cleft lip and palate patients. *Braz Oral Res*. 2014;28. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2014.vol28.0035>.
- Oliveira FVd, Santos CFd, Dionísio TJ, Neves LTd, Dalben GdS, Ambrosio ECP, Jorge PK, Machado MAAM, Oliveira TM. ENAM gene polymorphisms associated with dental anomalies in individuals with cleft lip and palate. *Braz J Oral Sci*. 2024;23:e241330. <https://doi.org/10.20396/bjos.v23i00.8671330>.
- Pinto LL, Ditterich RG, Vianna P. Vigilância da Fluoretação da Água de Abastecimento Público Destinada ao Consumo Humano no Brasil: Uma Revisão Integrativa. In: Santos DVDd, Shimakura SE, Zott TGG, Rattmann YD, Luhm KR editors. *Contribuições da Saúde Coletiva para as Redes de Atenção*. Guarujá, SP: Científica Digital; 2024. pp. 168-81.
- Pinto LL, Martins CdS, Vianna GDP, Gabardo MCL, Ditterich RG. Surveillance of the Quality of Water for Human Consumption (VIGIAGUA) and fluoridation of the Public Supply Network: Monitoring in a municipality in the Southern Region of Brazil. *Res Soc Dev*. 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16531>.
- 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;50:394-9. <https://doi.org/10.1597/11-200>.
- Salari N, Darvishi N, Heydari M, Bokaei S, Darvishi F, Mohammadi M. Global prevalence of cleft palate, cleft lip and cleft palate and lip: A comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2022;123:110-20. <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2021.05.008>.
- 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;47:2084-96. <https://doi.org/10.1177/0300060519832165>.
- Sundell AL, Nilsson AK, Ullbro C, Twetman S, Marcusson A. Caries prevalence and enamel defects in 5- and 10-year-old children with cleft lip and/or palate: A case-control study. *Acta Odontol Scand*. 2016;74:90-5. <https://doi.org/10.3109/00016357.2015.1044562>.
- von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Journal of clinical epidemiology*. 2008;61:344-9. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2007.11.008>.

Wanderley Lacerda RH, Filgueiras VM, Guedes Mendonça AC, Vieira AR. Molar-incisor hypomineralization in a cohort of individuals born with cleft lip and palate. *Orthod Craniofac Res.* 2024;27 Suppl 1:21-6. <https://doi.org/10.1111/ocr.12708>.

Tabela Suplementar 1 Associação entre DDE e os tipos de fissura.

Tipo de fissura	Dentição Permanente				Dentição Decídua			
	Tipo de DDE n (%)		RP _c (95% CI)		Tipo de DDE n (%)		RP _c (95% CI)	
	Fluorose				Fluorose			
	Sim	Não	Total	Valor de p	Sim	Não	Total	Valor de p
FL±P	29 (20,4)	113 (79,6)	142	0,75 (0,35-1,59)	2 (1,4)	140 (98,6)	142	-
FP	6 (27,3)	16 (72,7)	22	1	0 (0)	22 (100)	22	-
Hipoplasia								
	Sim	Não	Total		Sim	Não	Total	
FL±P	19 (13,4)	123 (86,6)	142	-	8 (5,6)	134 (94,4)	142	-
FP	0 (0)	22 (100)	22	-	0 (0)	22 (100)	22	-
Opacidade Demarcada								
	Sim	Não	Total		Sim	Não	Total	
FL±P	37 (26,1)	105 (73,9)	142	1,43 (0,57-3,63)	21 (14,8)	121 (85,2)	142	-
FP	4 (18,2)	18 (81,8)	22	1	0 (0)	22 (100)	22	-
HMI								
	Sim	Não	Total		Sim	Não	Total	
FL±P	43 (30,3)	99 (69,7)	142	1,33 (0,59-2,99)	30 (21,1)	112 (78,9)	142	0,66 (0,33-1,32)
FP	5 (22,7)	17 (77,3)	22	1	7 (31,8)	15 (68,2)	22	1

Legenda: FL±P – fissura labial com ou sem envolvimento de palato; FP – fissura palatina; DDE – defeito de desenvolvimento do esmalte; HMI – hipomineralização molar-incisivo; HSMD – hipomineralização de segundos molares decíduos.

5.2 ARTIGO 2

Associação entre polimorfismos genéticos e hipomineralização de molares e incisivos e de segundos molares decíduos em crianças com fissuras labiais com ou sem envolvimento de palato[†]

Gabriela Fonseca-Souza¹

Vitória Somma Tessari¹

Renato Assis Machado²

Christian Kirschneck³

Erika Calvano Küchler³

Juliana Feltrin-Souza¹

¹ Departamento de Estomatologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

² Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

³ Universidade de Bonn, Departamento de Ortodontia, Bonn, Alemanha.

[†] Artigo formatado conforme as normas do periódico *Oral Diseases*.

Associação entre polimorfismos genéticos e hipomineralização de molares e incisivos e de segundos molares decíduos em crianças com fissuras labiais com ou sem envolvimento de palato

Resumo

Objetivo: Avaliar a associação entre polimorfismos genéticos de nucleotídeo único (SNPs) em genes relacionados à homeostase do cálcio e a presença de hipomineralização molar-incisivo e de segundos molares decíduos (HMI/HSMD) em crianças com fissuras labiais com ou sem envolvimento de palato não sindrômicas (FL±PNS). Além de analisar a associação entre esses SNPs e a presença de FL±PNS, bem como interações entre SNPs e sua relação com HMI/HSMD e FL±PNS.

Métodos: Neste estudo transversal com grupo de comparação, a presença de HMI/HSMD foi avaliada por duas examinadoras calibradas, segundo os critérios de Ghanim et al. (2015). Foram analisados os SNPs rs1544410, rs7975232, rs2228570 (*VDR*), rs927650 (*CYP24A1*), rs6256, rs307247, rs694 (*PTH*) e rs1801197 (*CALCR*), por PCR em tempo real. As análises estatísticas incluíram o teste do qui-quadrado, regressão de Poisson com variância robusta e o método *model-based multifactor dimensionality reduction* (mbmdr), com nível de significância de 5%.

Resultados: Foram incluídas 230 crianças entre 6 e 14 anos, sendo 142 com FL±PNS e 105 sem FL±PNS. A prevalência de HMI/HSMD foi maior no grupo FL±PNS (44,8%) em comparação ao controle (37,1%), sem significância estatística ($p = 0,240$). Nenhum dos SNPs avaliados apresentou associação significativa com HMI/HSMD ou FL±PNS na análise multivariada ($p > 0,05$). Interações entre rs1801197 (*CALCR*) e rs927650 (*CYP24A1*), e entre rs307247 (*PTH*) e rs927650 (*CYP24A1*) foram significativamente associadas à presença de FL±PNS (p permutado = 0,009 e 0,04, respectivamente). A interação entre rs6256 (*PTH*) e rs1801197 (*CALCR*) foi significativamente associada à presença simultânea de FL±PNS e HMI/HSMD (p permutado = 0,007).

Conclusão: Não foram observadas associações entre os SNPs isolados e a presença de HMI/HSMD ou FL±PNS. No entanto, interações entre os genes *CALCR* e *CYP24A1* mostraram associação com FL±PNS, e a interação entre *PTH* e *CALCR* foi associada à presença simultânea de FL±PNS e HMI/HSMD.

Palavras-chave: fenda labial; fissura palatina; hipomineralização molar; polimorfismo genético; vitamina d.

1 Introdução

A hipomineralização molar-incisivo (HMI) foi definida em 2001 como um defeito qualitativo do esmalte que afeta de um a quatro primeiros molares permanentes, estando frequentemente associada a incisivos afetados (Weerheijm et al. 2001). Clinicamente, caracteriza-se alterações na translucidez e aumento da porosidade do esmalte, podendo levar à sensibilidade dentária, fraturas pós-eruptivas e dificuldades restauradoras (Mendonça et al. 2024). Essas alterações comprometem significativamente a qualidade de vida dos pacientes e representam um desafio clínico, exigindo maior demanda por tratamentos odontológicos e risco aumentado de falhas dos tratamentos realizados (Jälevik et al. 2022). Defeitos similares à HMI são também observados em segundos molares decíduos, recebendo o nome de hipomineralização de segundos molares decíduos (HSMD), sendo a presença de HSMD considerada preditiva para a HMI (Garot et al. 2018; Jälevik et al. 2022).

Estudos têm demonstrado uma maior prevalência de defeitos do desenvolvimento do esmalte (DDE), incluindo HMI e HSMD, em populações com anomalias craniofaciais, como as fissuras labiais com ou sem envolvimento de palato não sindrômicas (FL±PNS) (Farias et al. 2023; Wanderley Lacerda et al. 2024). Essas malformações, consideradas as anomalias congênitas mais comuns que afetam a região orofacial (Wang et al. 2025), resultam da falha na fusão dos processos faciais durante a embriogênese, apresentando origem multifatorial. Além das alterações morfofuncionais decorrentes das fissuras, indivíduos com FL±PNS frequentemente apresentam anomalias dentárias, incluindo agenesias dentárias, dentes supranumerários, taurodontismo e DDE (Fonseca-Souza et al. 2022). A ocorrência concomitante de FL±PNS e HMI/HSMD sugere a possível participação de mecanismos biológicos compartilhados, o que reforça a necessidade de investigações que explorem os fatores genéticos envolvidos na formação do esmalte nesses indivíduos.

A etiologia da HMI/HSMD ainda não está completamente elucidada, sendo considerada multifatorial, envolvendo fatores ambientais, sistêmicos e genéticos (Lopes-Fatturi et al. 2025; Fatturi et al. 2019). Estudos têm demonstrado que a adequada homeostase mineral, especialmente dos níveis de cálcio (Ca) e fosfato (P), é fundamental para a formação e mineralização do esmalte, garantindo na sua composição mais de 90% do conteúdo inorgânico, e, portanto, determinando a sua alta dureza. A regulação da homeostase do Ca envolve uma complexa rede de interações moleculares, destacando-se atuação da vitamina D, do paratormônio e da calcitonina (Yu & Sharma 2023), cujos efeitos são mediados por diversos genes como *VDR*, *CYP24A1*, *PTH* e *CALCR*. Além de seu papel no equilíbrio de íons essenciais

ao desenvolvimento dentário, esses genes apresentam expressão durante a odontogênese, incluindo nos processos de formação do esmalte (Houari et al. 2016; Zhang et al. 2009; Foster et al. 2014; Sakakura et al. 1989; Bawden et al. 1983). Dessa forma, é plausível considerar que alterações genéticas, como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), podem afetar a mineralização dentária, aumentando a susceptibilidade de ocorrência de defeitos de desenvolvimento dentário. Embora alguns estudos tenham investigado a associação entre essas variantes genéticas com alterações dentárias e craniofaciais, como cárie dentária (Sadeghi et al. 2021), HMI (Renostro-Souza et al. 2024; Fatturi et al. 2020), atraso na ID (Madalena et al. 2025) e retrognatismo mandibular (Küchler et al. 2021), ainda não há evidências disponíveis sobre essas associações em populações com FL±PNS.

Condições complexas, como a HMI/HSMD, não ocorrem apenas de forma isolada, mas também por meio de interações entre variantes genéticas, um fenômeno conhecido como epistasia, na qual ocorre a modulação de um gene ou variante genética pela presença do outro (Motsinger & Ritchie 2006). No contexto da mineralização dentária, a análise de interações entre SNPs pode fornecer informações mais precisas sobre os mecanismos genéticos envolvidos, especialmente quando múltiplas vias fisiológicas, como as reguladas por *VDR*, *CYP24A1*, *PTH* e *CALCR*, convergem para o mesmo processo biológico.

Diante do exposto, este estudo transversal com grupo de comparação teve como objetivo principal avaliar a associação entre SNPs nos genes envolvidos na homeostase do cálcio – *VDR*, *CYP24A1*, *PTH* e *CALCR* e a ocorrência de HMI/HSMD em crianças com FL±PNS. Além disso, buscou-se investigar se interações genéticas entre pares de SNPs nesses mesmos genes estão associadas à presença de HMI/HSMD. Como objetivo secundário, avaliou-se a possível associação entre esses polimorfismos, isoladamente ou em combinação, e a ocorrência de FL±PNS.

2 Metodologia

2.1 Aspectos éticos

Este estudo transversal com grupo de comparação foi conduzido em conformidade com as diretrizes do *checklist* STREGA (*Strengthening the Reporting of Genetic Association Studies*) (Little et al. 2009). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (protocolo nº: 5.100.185) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da área de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná

(protocolo nº: 3.752.172), ambos localizados na cidade de Curitiba, Paraná, Brasil. A participação na pesquisa ocorreu mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos responsáveis legais e do Termo de Assentimento pelas crianças.

2.2 Seleção da amostra

A amostra do estudo foi composta por crianças de ambos os sexos, com idades entre 6 e 14 anos divididas em dois grupos: um grupo formado por crianças com FL±PNS e um grupo de comparação, constituído por crianças sem presença de fissuras (grupo de comparação/controle). Os participantes do grupo FL±PNS foram selecionados no Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Labiopalatal (CAIF), localizado em Curitiba, Paraná, Brasil. O grupo controle, por sua vez, foi recrutado na clínica de Odontopediatria da Universidade Federal do Paraná (UFPR), na mesma cidade. A ausência de FL±PNS foi confirmada por exame clínico. Indivíduos com síndromes e outras malformações craniofaciais que não envolvessem fissuras não foram incluídos.

O grupo FL±PNS incluiu diferentes formas de manifestação clínica da fissura: labial isolada (FL) e labiopalatina (FLP). Casos de fissura palatina isolada (FP) não foram incluídos, uma vez que essa condição apresenta origem embriológica distinta das demais (Martinelli et al. 2020). A categorização das fissuras foi realizada por meio de exame clínico, com confirmação por registro em prontuário. A coleta dos dados ocorreu entre janeiro de 2022 e agosto de 2023.

Para definição do tamanho amostral, foram utilizados dados prévios sobre a frequência de anomalias dentárias em indivíduos com fissura, com prevalência estimada de 38,8% (Fonseca-Souza et al. 2022). Foram adotados nível de confiança de 95%, poder estatístico de 80% e razão de chances (*odds ratio*) estimada de 3,14. Considerando a possibilidade de perdas amostrais, foi aplicado um acréscimo de 20% à estimativa inicial. Dessa forma, definiu-se como tamanho ideal da amostra um total entre 100 e 120 participantes por grupo.

2.3 Coleta de dados clínicos

A presença de HMI/HSMD foi avaliada por meio de exame clínico oral utilizando-se o critério proposto por Ghanim et al. (2015) para estudos epidemiológicos sobre hipomineralização do esmalte. Os participantes foram examinados em ambiente odontológico, sob iluminação artificial e com auxílio de espelho bucal.

Previamente à coleta de dados, duas examinadoras (GFS e VST) foram calibradas de acordo com o protocolo de Ghanim et al. (2015). Esse sistema de classificação categoriza as lesões de HMI e HSMD de acordo com sua gravidade, englobando opacidades brancas ou creme, opacidades amareladas ou marrons, fraturas pós-eruptivas do esmalte, restaurações atípicas, lesões de cárie atípica e extrações atípicas. Além da HMI e HSMD, o critério contempla outros DDE, como opacidades difusas, hipoplasia, amelogênese imperfeita e opacidades demarcadas (Ghanim et al. 2015).

A calibração foi conduzida em duas etapas. Inicialmente, as avaliadoras participaram de um módulo teórico, no qual 20 fotografias intraorais de diferentes tipos de DDE foram analisadas. Em seguida, cada examinadora avaliou, de forma independente, um conjunto distinto de 30 fotografias clínicas com diferentes apresentações de DDE. Após um intervalo de sete dias, esse mesmo conjunto de fotografias foi reavaliado individualmente. As respostas obtidas foram comparadas às de um examinador considerado padrão de referência. A confiabilidade das avaliações foi medida pelo coeficiente kappa, sendo os índices de concordância intra e interexaminadores superiores a 0,80, indicando excelente reprodutibilidade.

2.4 Análise genética

Amostras celulares foram obtidas por meio de enxágue bucal com 5 mL de solução salina estéril, a partir do qual foi realizada a extração do DNA genômico, seguindo o protocolo descrito por Kuchler et al. (2012).

Foram selecionados SNPs em genes associados à homeostase do cálcio – rs1544410, rs7975232 e rs2228570 no *VDR*; rs927650 no *CYP4A1*; rs6256, rs307247 e rs694 no *PTH*; e rs1801197 no *CALCR*. A escolha dos SNPs baseou-se na frequência do alelo menor (*minor allele frequency* >10%) e em evidências de sua possível influência sobre o processo de amelogênese (Houari et al. 2016; Zhang et al. 2009; Foster et al. 2014; Sakakura et al. 1989; Bawden et al. 1983). Partiu-se da premissa de que esses genes podem estar envolvidos no desenvolvimento do esmalte dentário, e que variantes genéticas comuns poderiam contribuir para o aparecimento da HMI/HSMD. As informações detalhadas sobre os genes e seus respectivos SNPs estão apresentadas na Tabela 1.

A genotipagem foi realizada por meio do PCR em tempo real, com ensaios de discriminação alélica, utilizando o sistema *StepOnePlus™ Real-Time PCR* (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, EUA). A taxa de sucesso dos ensaios genéticos ficou entre 96,9% e 99,1% (Tabela suplementar 1).

Tabela 1. Características dos genes e SNPs selecionados.

Gene	SNP	Posição	Alelos	Função SNP	Frequência global do alelo menor
Vitamin D Receptor (<i>VDR</i>)	rs1544410	chr12:47846052	T/C	Variante intrônica	T=0,381
	rs7975232	chr12:47845054	A/C	Variante intrônica	C=0,464
	rs2228570	chr12:47879112	A/G	Variante no códon de iniciação	A=0,377
Cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1 (<i>CYP24A1</i>)	rs927650	chr20:54156202	C/T	Variante intrônica	T=0,451
Parathyroid hormone (<i>PTH</i>)	rs6256	chr11:13492506	G/T	<i>Stop gained</i>	T=0,127
	rs307247	chr11:13491931	A/G	Variante a 500pb a jusante	A=0,393
	rs694	chr10:77790869	C/T	Variante intrônica	C=0,429
Calcitonin receptor (<i>CALCR</i>)	rs1801197	chr7:93426441	A/G	<i>Missense</i>	G=0,306

2.5 Análise estatística

Para avaliar a associação entre a FL±PNS e HMI/HSMD, aplicou-se o teste do qui-quadrado. A análise da relação entre essas variáveis dependentes (FL±PNS e HMI/HSMD) e as variáveis independentes – como sexo e genótipos relacionados a genes associados à homeostase do cálcio – foi conduzida por meio de regressão de Poisson com variância robusta. As variáveis FL±PNS e HMI/HSMD foram tratadas de forma dicotômica (presença = “sim”; ausência = “não”).

Os SNPs genéticos foram analisados de acordo com três modelos de herança: codominante, dominante e recessivo. Para a construção dos modelos múltiplos, adotou-se o método *stepwise*, incluindo no modelo final as variáveis independentes que apresentaram valor de p inferior a 0,20 na análise univariada. O nível de significância estatística adotado foi de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram executadas no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi testado para cada SNP por meio do teste do qui-quadrado, utilizando a ferramenta online disponível em <https://wpcalc.com/en/equilibrium->

hardy-weinberg. Foram considerados desvios do EHW os casos em que o valor de qui-quadrado ultrapassou 3,84 (Tabela Suplementar 1).

As interações entre os SNPs dos genes *VDR* (rs1544410, rs7975232 e rs2228570), *CYP24A1* (rs927650), *PTH* (rs6256, rs307247 e rs694) e *CALCR* (rs1801197) foram avaliadas por meio do teste *model-based multifactor dimensionality reduction (mbmdr)*, utilizando o pacote mbmdr no *software* R. As análises foram ajustadas pelo sexo e etnia com aplicação de validação cruzada e 1000 permutações, a fim de minimizar a ocorrência de interações falso-positivas. O *software* STRING, uma ferramenta para análise de redes de interação proteína-proteína, foi utilizado para investigar as interações funcionais entre os genes analisados (<https://string-db.org/>) (Szkłarczyk et al. 2023).

3 Resultados

Um total de 292 crianças participou da fase de recrutamento e triagem. Foram excluídas 62 delas por apresentarem condições como síndromes ($n = 13$), outras anomalias craniofaciais que não a fissura oral ($n = 5$), FP ($n = 20$), por não possuírem exame clínico completo ($n = 13$) ou amostra de DNA disponível ($n = 11$). Dessa forma, a amostra do estudo foi composta por 230 crianças, sendo 142 FL±PNS e 105 controles. A distribuição por sexo foi equilibrada, com predomínio do sexo masculino no grupo FL±PNS (58,4%) e do sexo feminino no grupo controle (52,3%). Em relação à classificação das fissuras no grupo FL±PNS, 42 crianças apresentavam FL e 83 FLP. A média de idade foi semelhante entre os grupos, sendo 8,85 anos (DP=2,12) no grupo FL±PNS e 8,60 anos (DP=2,01) no grupo controle, resultando em uma média geral de 8,74 anos (DP=2,07) (Tabela Suplementar 2).

Embora a presença de HMI/HSMD tenha sido mais frequente no grupo com FL±PNS (44,8%) em comparação ao grupo controle (37,1%), não foi observada associação estatisticamente significativa entre essas variáveis ($p=0,240$) (Tabela Suplementar 3).

Na análise univariada avaliando a associação entre HMI/HSMD e as variáveis independentes, foi identificada uma associação estatisticamente significativa com o SNP rs7975232 no gene *VDR*, sob o modelo de herança dominante. Indivíduos com o genótipo AA apresentaram menor frequência de HMI/HSMD em comparação àqueles que possuíam pelo menos um alelo C (AC+CC) ($p = 0,024$). No entanto, essa associação não se manteve significativa na análise multivariada (Tabela 2).

Em relação à presença de FL±PNS, apenas o SNP rs694 no gene *PTH* apresentou associação significativa no modelo recessivo. Indivíduos com o genótipo CC apresentaram menor frequência de FL±PNS em relação àqueles com pelo menos um alelo T (CT+TT) ($RP_c = 0,68$; $IC95\% = 0,47-0,99$; $p = 0,043$). Contudo, essa associação não se manteve significativa na análise multivariada ($RP_a = 0,71$; $IC95\% = 0,48-1,05$) (Tabela Suplementar 4).

Buscou-se verificar se interações entre pares de SNPs nos genes avaliados poderiam aumentar o risco preditivo para FL±PNS e para FL±PNS associada à HMI/HSMD. Todas as combinações possíveis entre pares foram analisadas, porém apenas aquelas com valores de p nominais ($p < 0,05$) estão apresentadas na Tabela 3. Para FL±PNS, as interações entre os SNPs rs1801197 (*CALCR*) e rs927650 (*CYP24A1*) ($p_{perm} = 0,009$), bem como entre rs107247 (*PTH*) e rs927650 (*CYP24A1*) ($p_{perm} = 0,04$), permaneceram estatisticamente significativas após os testes de permutação. Considerando a presença simultânea de FL±PNS e HMI/HSMD, observou-se associação significativa entre os SNPs rs6256 (*PTH*) e rs1801197 (*CALCR*), também confirmada após o teste de permutação ($p_{perm} = 0,007$) (Tabela 3).

Tabela 2. Razão de prevalência HMI/HSMD segundo os grupos e os genótipos dos genes associados ao metabolismo da vitamina D (n=230).

Variável	Categorias	HMI/HSMD			RP _c (IC 95%)	Valor de p	RP _a (IC 95%)*
Group		Sim n (%)	Não n (%)	Total			
rs1544410 (VDR)	FL±PNS	56 (44,8)	69 (55,2)	125	1,21 (0,88-1,65)	0,245	-
	Controle	39 (37,1)	66 (62,9)	105	Referência		-
Modelo codominante	TT	6 (22,2)	21 (77,8)	27	0,54 (0,26-1,14)	0,106	-
	CT	43 (41,0)	62 (59,0)	105	Referência		-
	CC	44 (46,3)	51 (53,7)	95	1,13 (0,82-1,55)	0,445	-
	CC	44 (46,3)	51 (53,7)	95	1,25 (0,91-1,70)	0,162	-
Modelo dominante	CT + TT	49 (37,1)	83 (62,9)	132	Referência		-
	TT	6 (22,2)	21 (77,8)	27	0,51 (0,25-1,05)	0,069	0,68 (0,31-1,50)
Modelo recessivo	CT + CC	87 (43,5)	113 (56,5)	200	Referência		Referência
rs7975232 (VDR)							
Modelo codominante	AA	25 (30,5)	57 (69,5)	82	0,61 (0,42-0,89)	0,011	-
	AC	48 (50,0)	48 (50,0)	96	Referência		-
	CC	18 (40,0)	27 (60,0)	45	0,80 (0,53-1,20)	0,286	-
Modelo dominante	AA	25 (30,5)	57 (69,5)	82	0,65 (0,45-0,94)	0,024	0,72 (0,48-1,08)
	AC + CC	66 (46,8)	75 (53,2)	141	Referência		Referência
Modelo recessivo	CC	18 (40,0)	27 (60,0)	45	0,97 (0,55-1,45)	0,903	-
	AC + AA	73 (41,0)	105 (59,0)	178	Referência		-
rs2228570 (VDR)							
Modelo codominante	AA	12 (35,3)	22 (64,7)	34	0,75 (0,46-1,24)	0,264	-
	AG	52 (46,8)	59 (53,2)	111	Referência		-
	GG	30 (36,1)	53 (63,9)	83	0,77 (0,55-1,09)	0,144	-
Modelo dominante	GG	30 (36,1)	53 (63,9)	83	0,82 (0,58-1,15)	0,249	-
	AG + AA	64 (44,1)	81 (55,9)	145	Referência		-
Modelo recessivo	AA	12 (35,3)	22 (64,7)	34	0,83 (0,51-1,35)	0,465	-
	AG + GG	82 (42,3)	112 (57,7)	194	Referência		-
rs927659 (CYP24A1)							
Modelo codominante	CC	26 (39,4)	40 (60,6)	66	1,11 (0,77-1,61)	0,563	-
	CT	47 (43,9)	60 (56,1)	107	Referência		-
	TT	19 (35,2)	35 (64,8)	54	0,89 (0,56-1,43)	0,637	-
Modelo dominante	CC	26 (39,4)	40 (60,6)	66	0,96 (0,67-1,37)	0,825	-
	CT + TT	66 (41,0)	95 (59,0)	161	Referência		-

Variável	Categorias	HMI/HSMD			Total	RP _c (IC 95%)	Valor de p	RP _a (IC 95%)*
		Sim n (%)	Não n (%)					
Modelo recessivo	TT	19 (35,2)	35 (64,8)	54	0,83 (0,56-1,25)		0,375	-
	CT + CC	73 (42,2)	100 (57,8)	173	Referência			-
rs6256 (PTH)								
Modelo codominante	GG	68 (40,0)	102 (60,0)	170	Referência			-
	GT	21 (42,9)	28 (57,1)	49	1,07 (0,77-1,55)		0,716	-
	TT	2 (28,6)	5 (71,4)	7	0,71 (0,22-2,34)		0,578	-
Modelo dominante	GG	68 (40,0)	102 (60,0)	170	Referência		0,887	-
	GT + TT	23 (41,1)	33 (58,9)	56	1,03 (0,71-1,48)			-
	TT	2 (28,6)	5 (71,4)	7	0,70 (0,22-2,29)			-
Modelo recessivo	GT + GG	89 (40,6)	130 (59,4)	219	Referência		0,559	-
rs307247 (PTH)								
Modelo codominante	AA	13 (32,5)	27 (67,5)	40	0,80 (0,48-1,33)		0,388	-
	AG	41 (40,6)	60 (59,4)	101	Referência			-
	GG	39 (44,8)	48 (55,2)	87	1,10 (0,79-1,54)		0,558	-
Modelo dominante	GG	39 (44,8)	48 (55,2)	87	1,17 (0,86-1,60)		0,325	-
	AG + AA	54 (38,3)	87 (61,7)	141	Referência			-
	AA	13 (32,5)	27 (67,5)	40	0,76 (0,47-1,23)			-
Modelo recessivo	AG + GG	80 (42,6)	108 (57,4)	188	Referência		0,268	-
rs694 (PTH)								
Modelo codominante	CC	17 (35,4)	31 (64,6)	48	0,85 (0,55-1,32)		0,538	-
	CT	48 (41,7)	67 (58,3)	115	Referência			-
	TT	29 (43,9)	37 (56,1)	66	1,05 (0,74-1,49)		0,084	-
Modelo dominante	TT	29 (43,9)	37 (56,1)	66	1,10 (0,79-1,53)			-
	CT + CC	65 (39,9)	98 (60,1)	163	Referência		0,566	-
	CC	17 (35,4)	31 (64,6)	48	0,55 (1,26)			-
Modelo recessivo	CT + TT	77 (42,5)	104 (57,5)	181	Referência		0,390	-

Negrito significa valores estatisticamente significantes.

Abreviaturas: FL±PNS – fissura labial com ou sem fissura palatina não sindrômica; HMI/HSMD – hipomineralização molar-incisvo/hipomineralização de segundos molares decíduos; RP_c – razão de prevalência bruta; RP_a – razão de prevalência ajustada; IC 95% – intervalo de confiança de 95%.

* Para a realização da análise de regressão de Poisson múltipla, as variáveis independentes com p<0,20 no modelo univariado foram incluídas nos modelos múltiplos. A RP_a foi calculada com ajuste pelas seguintes variáveis independentes: modelo recessivo para rs1544410 (*VDR*) e modelo dominante para rs7975232 (*VDR*).

Tabela 3. Interações SNP-SNP entre *VDR*, *CYP24A1*, *CALCR* e *PTH* avaliadas por meio do teste *model-based multifactor dimensionality reduction* (mbmdr).

	SNP1	SNP2	NH ^a	betaH ^b	NL ^c	betaL ^d	Valor de P ^e	Valor de P Permutado ^f
FL±PNS	rs1801197 (<i>CALCR</i>)	rs927650 (<i>CYP24A1</i>)	2	1,3226	1	-0,8139	0,0004	0,009
	rs107247 (<i>PTH</i>)	rs927650 (<i>CYP24A1</i>)	0	NA	2	-0,8514	0,004	0,04
	rs1801197 (<i>CALCR</i>)	rs1544410 (<i>VDR</i>)	1	0,7195	0	NA	0,02	0,16
	rs1801197 (<i>CALCR</i>)	rs7975232 (<i>VDR</i>)	0	NA	1	-1,4327	0,03	0,23
	rs927650 (<i>CYP24A1</i>)	rs7975232 (<i>VDR</i>)	1	0,9843	0	NA	0,03	0,22
	rs6256 (<i>PTH</i>)	rs1801197 (<i>CALCR</i>)	1	0,5652	0	NA	0,04	0,24
FL±PNS sem HMI/HSMD	rs1801197 (<i>CALCR</i>)	rs927650 (<i>CYP24A1</i>)	2	1,2132	0	NA	0,008	0,05
	rs107247 (<i>PTH</i>)	rs1544410 (<i>VDR</i>)	0	NA	1	-1,0457	0,02	0,13
	rs1801197 (<i>CALCR</i>)	rs7975232 (<i>VDR</i>)	1	2,0941	1	-2,1854	0,04	0,19
	rs927650 (<i>CYP24A1</i>)	rs7975232 (<i>VDR</i>)	1	1,2030	0	NA	0,04	0,28
	rs6256 (<i>PTH</i>)	rs1801197 (<i>CALCR</i>)	1	1,523	2	-1,8328	0,002	0,007
	rs1801197 (<i>CALCR</i>)	rs1544410 (<i>VDR</i>)	1	1,415	0	NA	0,02	0,07
FL±PNS com HMI/HSMD	rs927650 (<i>CYP24A1</i>)	rs2228570 (<i>VDR</i>)	0	NA	1	-1,0367	0,03	0,13
	rs1801197 (<i>CALCR</i>)	rs927650 (<i>CYP24A1</i>)	1	1,596	1	-1,0809	0,04	0,14
	rs927650 (<i>CYP24A1</i>)	rs1544410 (<i>VDR</i>)	1	2,168	0	NA	0,04	0,17

Negrito significa valores estatisticamente significantes. ^a Número de genótipos de alto risco. ^b Coeficiente de regressão na interação. ^c Coeficiente de regressão de alto risco. ^d Coeficiente de regressão na interação. ^e Valor de p do modelo de interação ajustado pelas covariáveis. ^f Valor de p do modelo de interação com permutação.

Abreviaturas: FL±PNS – fissura labial e/ou palatina não síndrome; HMI – hipomineralização molar-incisivo; HSMD – hipomineralização de segundos molares deciduos.

4 Discussão

Pacientes com FL±PNS possuem alta frequência de anomalias dentárias se comparados à indivíduos sem fissura (Fonseca-Souza et al. 2022). Dentre as anomalias dentárias observadas, destacam-se os DDE, como a HMI/HSMD. No presente estudo, embora a frequência de HMI/HSMD tenha sido maior no grupo com FL±PNS (44,8%) em relação ao grupo controle (37,1%), essa diferença não foi estatisticamente significativa. Estudos prévios também relataram alta prevalência desses defeitos entre indivíduos com fissuras orais. Farias et al. (2023) observaram a presença desses defeitos em 52,1% da amostra, enquanto Wanderley-Lacerda et al. (2024) relataram prevalência de 67,7%. No entanto, nenhum dos estudos mencionados apresentaram grupo controle para fins de comparação. A ausência de associação significativa entre HMI/HSMD e FL±PNS no presente estudo pode estar relacionada ao perfil do grupo controle, recrutado em uma clínica escola, referência no diagnóstico e tratamento de DDEs, o que pode ter superestimado a prevalência desses defeitos em crianças sem FL±PNS. Cabe destacar que, em uma amostra populacional de escolares sem fissura da cidade de Curitiba-PR (Brasil), onde o estudo foi conduzido, a prevalência de HMI/HSMD é de aproximadamente 12% (Reyes et al. 2019).

A HMI/HSMD são defeitos qualitativos do esmalte, que ocorrem devido a falhas no processo de mineralização da matriz do esmalte durante a amelogênese (Gonçalves et al. 2024). A mineralização dentária depende de mecanismos complexos, nos quais o Ca exerce papel central, atuando tanto na formação dos cristais de hidroxiapatita quanto na regulação da atividade dos ameloblastos (Kim & Hong 2018). Considerando que a mineralização do esmalte é regulada por mecanismos complexos, nos quais o cálcio exerce um importante papel, o presente estudo investigou também a associação entre HMI/HSMD e polimorfismos em genes envolvidos nessa via metabólica em crianças com sem FL±PNS.

A regulação da homeostase de Ca envolve hormônios como a vitamina D, o paratormônio e a calcitonina (Yu & Sharma 2023). A vitamina D promove o aumento da absorção intestinal de Ca e sua reabsorção renal; o paratormônio é secretado em resposta à hipocalcemia e atua mobilizando Ca dos ossos e aumentando sua reabsorção nos rins; já a calcitonina, liberada diante da hipercalcemia, inibe a reabsorção óssea osteoclástica, contribuindo para a redução dos níveis séricos de Ca (Yu & Sharma 2023; Voltan et al. 2023). Os efeitos desses hormônios são mediados por genes como *VDR*, que codifica o receptor da vitamina D; *CYP24A1*, responsável pelo catabolismo da forma ativa da vitamina D; *PTH*, que codifica o paratormônio; e *CALCR*, que codifica o receptor da calcitonina. Além de suas

funções sistêmicas, esses genes apresentam expressão durante a odontogênese. O *VDR* é expresso em ameloblastos, influenciando sua diferenciação e a expressão de genes do esmalte, como a amelogenina (Berdal et al. 1995; Houari et al. 2016; Zhang et al. 2009). O *CYP24A1* está presente em células da polpa e do folículo dentário, além de participar da mineralização dos tecidos duros (Khanna-Jain et al. 2010). O *PTH* atua sobre odontoblastos na formação da dentina e está implicado no transporte de Ca durante a amelogênese (Bawden et al. 1983; Guimarães et al. 2014; Sakakura 1987). Por fim, o *CALCR* apresenta expressão na papila dentária de germes dentários em desenvolvimento, sugerindo possível papel regulador no processo de odontogênese (Sakakura et al. 1989).

Apesar do papel descrito dos genes relacionados ao metabolismo do cálcio no desenvolvimento dentário, nenhum dos SNPs avaliados no presente estudo apresentou associação com a ocorrência de HMI/HSMD de forma individual, contrastando com achados prévios da literatura. Fatturi et al. 2020 e Elzein et al. 2022 identificaram associação entre os polimorfismos rs739837 e rs78783628, no gene *VDR*, e a presença de HMI. Além da HMI, variantes nesses genes também foram associadas a outros desfechos dentários. No *VDR*, os polimorfismos rs10735810 e rs2228570 foram associados à suscetibilidade à cárie dentária (Nireeksha et al. 2022; Sadeghi et al. 2021), enquanto os polimorfismos rs694 e rs307247, no gene *PTH*, mostraram associação com variações no tamanho da coroa dentária (Gerber et al. 2023). Embora esses genes estejam principalmente envolvidos no desenvolvimento dentário, há hipóteses sobre sua possível participação em alterações do crescimento facial, como o retrognatismo mandibular (Küchler et al. 2021). No entanto, as evidências nessa área ainda são escassas e não permitem afirmar sua atuação direta na morfogênese craniofacial. No presente estudo, nenhum dos SNPs avaliados apresentou associação com a presença de FL±PNS.

Ao investigar a interação entre pares de SNPs em genes relacionados à homeostase do Ca, observou-se que determinadas combinações genótípicas estiveram associadas à presença de FL±PNS, mesmo na ausência de associação individual entre os polimorfismos avaliados. Especificamente, as interações entre rs1801197 (*CALCR*) e rs927650 (*CYP24A1*), bem como entre rs107247 (*PTH*) e rs927650 (*CYP24A1*), apresentaram associação significativa com FL±PNS. Além disso, quando considerada a presença simultânea de FL±PNS e HMI/HSMD, identificou-se associação significativa entre os SNPs rs6256 (*PTH*) e rs1801197 (*CALCR*). Embora não tenham sido identificadas interações físicas diretas entre os genes *PTH*, *CALCR* e *CYP24A1* na análise realizada por meio do banco de dados STRING, foi possível observar evidências de coexpressão entre *PTH* e *CYP24A1* e *PTH* e *CALCR* (Figura 1).

A coexpressão entre *PTH* e *CYP24A1* pode ser explicada pela atuação coordenada desses genes na modulação do metabolismo da vitamina D e do cálcio. O PTH, secretado em resposta à queda de íons cálcio, estimula enzimas como CYP27B1, ativando a vitamina D, enquanto CYP24A1 promove sua inativação, permitindo um ajuste equilibrado dos níveis de vitamina D ativa, especialmente em tecidos como o rim (Agrawal et al. 2024). Já a coexpressão observada entre *PTH* e *CALCR* reflete a regulação do cálcio por essas vias hormonais: o *PTH* aumenta os níveis de Ca^{2+} por meio da reabsorção óssea e renal, enquanto o *CALCR* inibe a reabsorção osteoclástica. Evidências mostram que o receptor do PTH é expresso em osteoblastos e osteoclastos, assim como CALCR nesses tecidos, sugerindo presença conjunta funcional que possibilita um mecanismo de contrarregulação fisiológica essencial na homeostase mineral (Babić Leko et al. 2021).

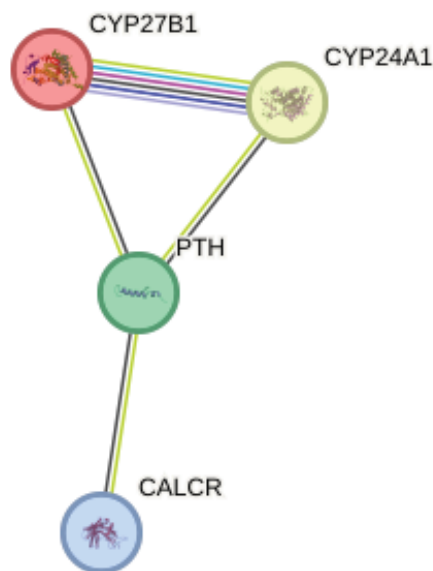


Figura 1. Rede de interação entre os genes *PTH*, *CALCR* e *CYP24A1*, gerada pelo software STRING (<https://string-db.org/>). As conexões indicam possíveis interações funcionais entre os genes: linhas pretas representam coexpressão gênica e linhas amarelas, associação com base na coocorrência em textos científicos (text mining).

Os achados do presente estudo sustentam a hipótese de que um possível efeito epistático entre variantes genéticas envolvidas na regulação mineral possa contribuir para a suscetibilidade às FL±PNS e à HMI/HSMD, no entanto os mecanismos biológicos envolvidos no desenvolvimento dessas condições permanecem pouco compreendidos, sendo necessários estudos adicionais. Ambas as condições apresentam etiologia complexa, resultante da interação

entre fatores genéticos e ambientais, o que dificulta a identificação de mecanismos causais isolados e reforça a necessidade de investigações que considerem essa multifatorialidade.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. O número reduzido de indivíduos em algumas comparações pode ter limitado o poder estatístico para detectar associações mais sutis. Para minimizar esse impacto, os defeitos HMI e HSMD foram agrupados, a fim de evitar análises com subgrupos demasiadamente pequenos. Apesar dessas limitações, o estudo apresenta pontos fortes importantes, destacando-se o uso de um grupo controle e a aplicação de análises ajustadas, que contribuem para a robustez dos resultados. Além disso, de acordo com o nosso conhecimento, é uma das primeiras investigações a explorar a interação entre variantes em genes relacionados à homeostase mineral em indivíduos com e sem FL±PNS, ampliando o conhecimento sobre possíveis mecanismos genéticos envolvidos na ocorrência simultânea de anomalias dentárias e fissuras.

Os achados deste estudo reforçam a importância da análise de interações gênicas em fenótipos complexos. Sugere-se que estudos futuros com amostras maiores e delineamentos multicêntricos sejam realizados para confirmar os achados do presente estudo. Investigações que avaliem a expressão e o papel biológico dessas variantes genéticas também são necessárias para melhor compreender os mecanismos envolvidos. Clinicamente, a identificação de marcadores genéticos associados a essas condições pode, no futuro, contribuir para estratégias de triagem precoce, prevenção e planejamento odontológico mais individualizado para populações de risco.

5 Conclusão

Conclui-se que os SNPs avaliados em genes relacionados ao metabolismo do Ca não apresentaram associação com a presença de HMI/HSMD ou FL±PNS de forma isolada. No entanto, interações entre os genes *CALCR* e *CYP24A1* mostraram associação significativa com FL±PNS, e a interação entre *PTH* e *CALCR* foi associada à presença concomitante de FL±PNS e HMI/HSMD.

Referências

Agrawal A, Balci H, Hanspers K, Coort SL, Martens M, Slenter DN, Ehrhart F, Digles D, Waagmeester A, Wassink I, Abbassi-Daloui T, Lopes EN, Iyer A, Acosta JM, Willighagen LG, Nishida K, Riutta A, Basaric H, Evelo CT, Willighagen EL, Kutmon M and Pico AR (2024).

WikiPathways 2024: next generation pathway database. *Nucleic Acids Research* 52, D1: D679-d689. <https://www.doi.org/10.1093/nar/gkad960>.

Babić Leko M, Pleić N, Gunjača I and Zemunik T (2021). Environmental Factors That Affect Parathyroid Hormone and Calcitonin Levels. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 1. <https://www.doi.org/10.3390/ijms23010044>.

Bawden JW, Deaton TG and Crenshaw MA (1983). The effects of parathyroid hormone, calcitonin, and vitamin D metabolites on calcium transport in the secretory rat enamel organ. *Journal of Dental Research* 62, 9: 952-5. <https://www.doi.org/10.1177/00220345830620090701>.

Berdal A, Papagerakis P, Hotton D, Bailleul-Forestier I and Davideau JL (1995). Ameloblasts and odontoblasts, target-cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3: a review. *The International Journal of Developmental Biology* 39, 1: 257-62.

Elzein R, Abdel-Sater F, Mehawej C, Jalkh N, Ayoub F and Chouery E (2022). Identification by whole-exome sequencing of new single-nucleotide polymorphisms associated with molar-incisor hypomineralisation among the Lebanese population. *European Archives of Paediatric Dentistry* 23, 6: 919-928. <https://www.doi.org/10.1007/s40368-022-00738-2>.

Farias A, Rojas-Gualdrón DF, Restrepo M, Zecchin KG, Bussaneli DG, Yupanqui K, Raposo-Amaral CE and Dos Santos-Pinto L (2023). Characterization of enamel developmental defects in patients with orofacial clefts and their relationship to surgical procedures. *Clinical Oral Investigations* 27, 12: 7809-7820. <https://www.doi.org/10.1007/s00784-023-05370-y>.

Fatturi AL, Menoncin BL, Reyes MT, Meger M, Scariot R, Brancher JA, Küchler EC and Feltrin-Souza J (2020). The relationship between molar incisor hypomineralization, dental caries, socioeconomic factors, and polymorphisms in the vitamin D receptor gene: a population-based study. *Clinical Oral Investigations* 24, 11: 3971-3980. <https://www.doi.org/10.1007/s00784-020-03263-y>.

Fatturi AL, Wambier LM, Chibinski AC, Assunção L, Brancher JA, Reis A and Souza JF (2019). A systematic review and meta-analysis of systemic exposure associated with molar incisor hypomineralization. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 47, 5: 407-415. <https://www.doi.org/10.1111/cdoe.12467>.

Fonseca-Souza G, de Oliveira LB, Wambier LM, Scariot R and Feltrin-Souza J (2022). Tooth abnormalities associated with non-syndromic cleft lip and palate: systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations* 26, 8: 5089-5103. <https://www.doi.org/10.1007/s00784-022-04540-8>.

Foster BL, Nociti FH, Jr. and Somerman MJ (2014). The rachitic tooth. *Endocrine Reviews* 35, 1: 1-34. <https://www.doi.org/10.1210/er.2013-1009>.

Garot E, Denis A, Delbos Y, Manton D, Silva M and Rouas P (2018). Are hypomineralised lesions on second primary molars (HSPM) a predictive sign of molar incisor hypomineralisation (MIH)? A systematic review and a meta-analysis. *Journal of Dentistry* 72: 8-13. <https://www.doi.org/10.1016/j.jdent.2018.03.005>.

Gerber JT, Weiss SG, Mijolaro LV, Silva CS, Petinati MFP, Meger MN, Honório HM, Rebellato NLB, Sebastiani AM, Kuchler EC and Scariot R (2023). Polymorphisms in hormonal-related genes might be associated with variations in permanent tooth crown size. *Orthodontics & Craniofacial Research* 26, 4: 539-545. <https://www.doi.org/10.1111/ocr.12638>.

Ghanim A, Elfrink M, Weerheijm K, Mariño R and Manton D (2015). A practical method for use in epidemiological studies on enamel hypomineralisation. *European Archives of Paediatric Dentistry* 16, 3: 235-46. <https://www.doi.org/10.1007/s40368-015-0178-8>.

Gonçalves JL, Carvalho FK, Queiroz AM and Paula-Silva FWG (2024). Implications of Histological and Ultrastructural Characteristics on the Chemical and Mechanical Properties of Hypomineralised Enamel and Clinical Consequences. *Monographs in Oral Science* 32: 43-55. <https://www.doi.org/10.1159/000538865>.

Guimarães GN, Rodrigues TL, de Souza AP, Line SR and Marques MR (2014). Parathyroid hormone (1-34) modulates odontoblast proliferation and apoptosis via PKA and PKC-dependent pathways. *Calcified Tissue International* 95, 3: 275-81. <https://www.doi.org/10.1007/s00223-014-9892-1>.

Houari S, Loiodice S, Jedeon K, Berdal A and Babajko S (2016). Expression of Steroid Receptors in Ameloblasts during Amelogenesis in Rat Incisors. *Frontiers in Physiology* 7: 503. <https://www.doi.org/10.3389/fphys.2016.00503>.

Jälevik B, Sabel N and Robertson A (2022). Can molar incisor hypomineralization cause dental fear and anxiety or influence the oral health-related quality of life in children and adolescents?-a systematic review. *European Archives of Paediatric Dentistry* 23, 1: 65-78. <https://www.doi.org/10.1007/s40368-021-00631-4>.

Khanna-Jain R, Vuorinen A, Sándor GK, Suuronen R and Miettinen S (2010). Vitamin D(3) metabolites induce osteogenic differentiation in human dental pulp and human dental follicle cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 122, 4: 133-41. <https://www.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.08.001>.

Kim HE and Hong JH (2018). The overview of channels, transporters, and calcium signaling molecules during amelogenesis. *Archives of Oral Biology* 93: 47-55. <https://www.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.05.014>.

Kuchler EC, Reis CLB, Marañón-Vásquez G, Nelson-Filho P, Matsumoto MAN, Stuari MBS, Oliveira M, Proff P and Kirschneck C (2021). Parathyroid Hormone Gene and Genes Involved in the Maintenance of Vitamin D Levels Association with Mandibular Retrognathism. *Journal of Personalized Medicine* 11, 5. <https://www.doi.org/10.3390/jpm11050369>.

Kuchler EC, Tannure PN, Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Granjeiro JM and Amorim LM (2012). Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *Journal of Applied Oral Science* 20, 4: 467-71. <https://www.doi.org/10.1590/s1678-77572012000400013>.

Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, Khoury MJ, Cohen B, Davey-Smith G, Grimshaw J, Scheet P, Gwinn M, Williamson RE, Zou GY, Hutchings K,

Johnson CY, Tait V, Wiens M, Golding J, van Duijn C, McLaughlin J, Paterson A, Wells G, Fortier I, Freedman M, Zecevic M, King R, Infante-Rivard C, Stewart A and Birkett N (2009). STrengthening the REporting of Genetic Association Studies (STREGA)--an extension of the STROBE statement. *Genetic Epidemiology* 33, 7: 581-98. <https://www.doi.org/10.1002/gepi.20410>.

Lopes-Fatturi A, Fonseca-Souza G, Wambier LM, Brancher JA, Küchler EC and Feltrin-Souza J (2025). Genetic polymorphisms associated with developmental defects of enamel: A systematic review. *International journal of paediatric dentistry* 35, 2: 298-310. <https://www.doi.org/10.1111/ipd.13233>.

Madalena IR, Küchler EC, Reis CLB, Matsumoto MAN, Stuaní MBS, Vilalba Paniagua Machado do Nascimento T, Kirschneck C, Baratto-Filho F, Menezes-Oliveira MAH and Lepri CP (2025). Association of PTH and vitamin D-related genes with dental development in Brazilian children: a cross-sectional study. *Brazilian Oral Research* 39: e033. <https://www.doi.org/10.1590/1807-3107bor-2025.vol39.033>.

Martinelli M, Palmieri A, Carinci F and Scapoli L (2020). Non-syndromic Cleft Palate: An Overview on Human Genetic and Environmental Risk Factors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 592271. <https://www.doi.org/10.3389/fcell.2020.592271>.

Mendonça FL, Grizzo IC, Alencar CRB and Rios D (2024). Restorative Therapy of MIH-Affected Molars. *Monographs in Oral Science* 32: 236-260. <https://www.doi.org/10.1159/000538890>.

Motsinger AA and Ritchie MD (2006). Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. *Human Genomics* 2, 5: 318-28. <https://www.doi.org/10.1186/1479-7364-2-5-318>.

Nireeksha N, Hegde MN, Shetty SS and Kumari SN (2022). FOK I Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Risk of Dental Caries: A Case-Control Study. *International Journal of Dentistry* 2022: 6601566. <https://www.doi.org/10.1155/2022/6601566>.

Renostro-Souza A, Fonseca-Souza G, Küchler EC, Vasconcelos KRF, Feltrin-Souza J, Kirschneck C, Matsumoto MAN, Lepri CP, Oliveira M and Thedei Júnior G (2024). Association of defects of enamel with polymorphisms in the vitamin D receptor and parathyroid hormone genes. *Brazilian Dental Journal* 35: e245900. <https://www.doi.org/10.1590/0103-6440202405900>.

Reyes MRT, Fatturi AL, Menezes J, Fraiz FC, Assunção L and Souza JF (2019). Demarcated opacity in primary teeth increases the prevalence of molar incisor hypomineralization. *Brazilian Oral Research* 33: e048. <https://www.doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0048>.

Sadeghi M, Golshah A, Godiny M, Sharifi R, Khavid A, Nikkerdar N and Tadakamadla SK (2021). The Most Common Vitamin D Receptor Polymorphisms (ApaI, FokI, TaqI, BsmI, and BglI) in Children with Dental Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Children* 8, 4. <https://www.doi.org/10.3390/children8040302>.

Sakakura Y (1987). Effects of parathyroid hormone on odontogenesis of the mouse embryonic molar tooth in vitro. *Calcified Tissue International* 40, 1: 49-54. <https://www.doi.org/10.1007/bf02555728>.

Sakakura Y, Fujiwara N, Sugawara M and Nawa T (1989). In vitro effects of calcitonin and/or parathyroid hormone on odontogenesis of mouse embryonic molars. *Journal of Dental Research* 68, 8: 1279-84. <https://www.doi.org/10.1177/00220345890680081301>.

Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, Gable AL, Fang T, Doncheva NT, Pyysalo S, Bork P, Jensen LJ and von Mering C (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research* 51, D1: D638-d646. <https://www.doi.org/10.1093/nar/gkac1000>.

Voltan G, Cannito M, Ferrarese M, Ceccato F and Camozzi V (2023). Vitamin D: An Overview of Gene Regulation, Ranging from Metabolism to Genomic Effects. *Genes* 14, 9. <https://www.doi.org/10.3390/genes14091691>.

Wanderley Lacerda RH, Filgueiras VM, Guedes Mendonça AC and Vieira AR (2024). Molar-incisor hypomineralization in a cohort of individuals born with cleft lip and palate. *Orthodontics & Craniofacial Research* 27 Suppl 1: 21-26. <https://www.doi.org/10.1111/ocr.12708>.

Wang Z, Qi W, Chen Y and Niu F (2025). Global, regional, and national burden of orofacial clefts, 1990-2021: an analysis of data from the global burden of disease study 2021. *Frontiers in Medicine* 12: 1609700. <https://www.doi.org/10.3389/fmed.2025.1609700>.

Weerheijm KL, Jälevik B and Alaluusua S (2001). Molar-incisor hypomineralisation. *Caries Research* 35, 5: 390-1. <https://www.doi.org/10.1159/000047479>.

Yu E and Sharma S (2023). Physiology, calcium. *StatPearls*. StatPearls Publishing: Treasure Island.

Zhang X, Beck P, Rahemtulla F and Thomas HF (2009). Regulation of enamel and dentin mineralization by vitamin D receptor. *Frontiers of Oral Biology* 13: 102-109. <https://www.doi.org/10.1159/000242400>.

Tabela Suplementar 1. Equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW).

SNP	Grupo	Genótipo n (%)			EHW (Chi²)	Taxa de sucesso da genotipagem
		TT	TC	CC		
rs1544410 (<i>VDR</i>)	Controle	13 (12,4)	43 (41,0)	49 (46,7)	0,542	98,7%
	FL±PNS	14 (11,5)	62 (50,8)	47 (37,7)	0,917	
rs7975232 (<i>VDR</i>)	Controle	38 (36,9)	41 (39,8)	24 (23,3)	3,675	96,9%
	FL±PNS	44 (36,7)	55 (45,8)	21 (17,5)	0,281	
rs2228570 (<i>VDR</i>)	Controle	14 (13,3)	51 (48,6)	40 (38,1)	0,128	99,1%
	FL±PNS	20 (16,3)	60 (48,8)	43 (35,0)	0,015	
rs927650 (<i>CYP24A1</i>)	Controle	28 (24,3)	61 (53,0)	26 (22,6)	0,431	98,7%
	FL±PNS	41 (26,7)	67 (46,9)	35 (24,5)	0,537	
rs1801197 (<i>CALCR</i>)	Controle	43 (41,7)	40 (38,8)	20 (19,4)	3,432	99,1%
	FL±PNS	43 (34,4)	63 (50,4)	19 (15,2)	0,271	
rs6256 (<i>PTH</i>)	Controle	74 (71,8)	24 (23,3)	5 (4,9)	2,461	98,3%
	FL±PNS	96 (78,0)	25 (20,3)	2 (1,6)	0,064	
rs307247 (<i>PTH</i>)	Controle	22 (21,2)	49 (47,1)	33 (31,7)	0,230	99,1%
	FL±PNS	18 (14,5)	53 (41,9)	54 (43,5)	0,709	
rs694 (<i>PTH</i>)	Controle	29 (27,6)	52 (49,5)	24 (22,9)	0,006	99,1%
	FL±PNS	19 (15,3)	63 (50,8)	42 (33,9)	0,340	

Abreviaturas: FL±PNS – fissura labial com ou sem envolvimento de palato não-sindrômica.

Tabela Suplementar 2. Características da amostra (n=230).

Variável	Categoria	Grupo n (%)		Total
		FL±PNS (n=142)	Controle (n=105)	
Sexo	Feminino	52 (47,7)	57 (52,3)	109
	Masculino	73 (58,4)	48 (41,6)	125
Classificação da fissura	FL	42 (100)	-	42
	FLP	83(100)	-	83
Idade	Média (DP)	8,85 (2,12)	8,60 (2,01)	8,74 (2,07)

Abreviaturas: FL±PNS – fissura labial com ou sem envolvimento de palato não-sindrômica; FL – fissura labial; FLP – fissura labiopalatina; DP – desvio padrão.

Tabela Suplementar 3. Associação entre HMI/HSMD e o grupo (n=230).

Tabela suplementar 1: Associação entre HMI/HSMD e o grupo (n = 259)				
Grupo	HMI/HSMD		Total	Valor de p*
	Sim n (%)	Não n (%)		
HMI/HSMD total				
FL±PNS	56 (44,8)	69 (55,2)	125	0,240
Controle	39 (37,1)	66 (62,9)	105	
Opacidade branca/creme				
FL±PNS	41 (32,8)	84 (67,2)	125	0,489
Controle	30 (28,6)	75 (71,4)	105	
Opacidade amarela/marrom				
FL±PNS	15 (12,0)	110 (88,0)	125	0,474
Controle	16 (15,2)	89 (84,8)	105	
Fratura pós-eruptiva				
FL±PNS	11 (8,8)	114 (91,2)	125	0,951
Controle	9 (8,6)	96 (91,4)	105	

Restauração atípica				
FL±PNS	15 (12,0)	110 (88,0)	125	0,548
Controle	10 (9,5)	95 (90,5)	105	
Cárie atípica				
FL±PNS	7 (5,6)	118 (94,4)	125	0,736
Controle	7 (6,7)	98 (93,3)	105	
Extração atípica				
FL±PNS	3 (2,4)	122 (97,6)	125	0,379*
Controle	1 (1,0)	104 (99,0)	105	

Abreviaturas: FL±PNS – fissura labial com ou sem envolvimento de palato não-sindrômica; HMI – hipomineralização molar-incisivo; HSMD – hipomineralização de segundos molares decíduos.

Valor de p: teste chi-quadrado *Teste exato de Fisher.

Tabela Suplementar 4. Razão de prevalência de FL±PNS segundo o sexo e os genótipos dos genes associados ao metabolismo da vitamina D (n=230).

Variável	Categorias	FL±PNS		Total	RP _c (IC 95%)	Valor de p	RP _a (IC 95%)*
Sex	Female	Sim n (%)	Não n (%)	109	Referência	0,059	Referência 1,24 (0,97-1,58)
	Male	73 (60,3)	48 (39,7)	221	1,26 (0,99-1,61)		
rs1544410 (VDR)							
Modelo codominante	TT	14 (51,9)	13 (48,1)	27	0,88 (0,59-1,31)	0,521	-
	CT	62 (59,0)	43 (41,0)	105	Referência		-
	CC	46 (48,4)	49 (51,6)	95	0,82 (0,63-1,06)	0,137	-
Modelo dominante	CC	46 (48,4)	49 (51,6)	95	0,84 (0,65-1,08)	0,181	0,84 (0,65-1,07) Referência
	CT + TT	76 (57,6)	56 (42,4)	132	Referência		
	TT	14 (51,9)	13 (48,1)	27	0,96 (0,65-1,41)	0,836	-
CT + CC	108 (54,0)	92 (46,0)	200	Referência			
rs7975232 (VDR)							
Modelo codominante	AA	44 (53,7)	38 (46,3)	82	0,94 (0,72-1,22)	0,628	-
	AC	55 (57,3)	41 (42,7)	96	Referência		-
	CC	21 (46,7)	24 (53,3)	45	0,81 (0,57-1,16)	0,260	-
Modelo dominante	AA	44 (53,7)	38 (46,3)	82	0,99 (0,77-1,28)	0,972	-
	AC + CC	76 (53,9)	65 (46,1)	141	Referência		
	CC	21 (46,7)	24 (53,3)	45	0,84 (0,60-1,18)	0,310	-
AC + AA	99 (55,6)	79 (44,4)	178	Referência			
rs2228570 (VDR)							
Modelo codominante	AA	20 (58,8)	14 (41,2)	34	1,09 (0,78-1,51)	0,615	-
	AG	60 (54,1)	51 (45,9)	111	Referência		-
	GG	43 (51,8)	40 (48,2)	83	0,76 (0,73-1,25)	0,757	-
Modelo dominante	GG	43 (51,8)	40 (48,2)	83	0,94 (0,73-1,21)	0,627	-
	AG + AA	80 (55,2)	65 (44,8)	145	Referência		
	AA	20 (58,8)	14 (41,2)	34	1,11 (0,81-1,51)	0,518	-
AG + GG	103 (53,1)	91 (46,9)	194	Referência			
rs927650 (CYP24A1)							
Modelo codominante	CC	38 (57,6)	28 (42,4)	66	1,16 (0,88-1,54)	0,295	-
	CT	53 (49,6)	54 (50,5)	107	Referência		-
	TT	32 (59,3)	22 (40,7)	54	1,20 (0,89-1,60)	0,229	-
Modelo dominante	CC	38 (57,6)	28 (42,4)	66	1,09 (0,95-1,40)	0,503	-
	CT + TT	85 (52,8)	76 (47,2)	161	Referência		
	TT	32 (59,3)	22 (40,7)	54	0,13 (0,87-1,46)	0,374	-
CT + CC	91 (52,6)	82 (47,4)	173	Referência			
rs6256 (PTH)							
Modelo codominante	GG	96 (56,5)	74 (43,5)	170	Referência		-

Variável	Categorias	FL±PNS		Total	RP _c (IC 95%)	Valor de p	RP _a (IC 95%)*
		Sim n (%)	Não n (%)				
Modelo dominante	GT	25 (51,0)	24 (49,0)	49	0,90 (0,67-1,22)	0,513	-
	TT	2 (28,6)	5 (71,4)	7	0,51 (0,16-1,64)	0,257	-
	GG	96 (56,5)	74 (43,5)	170	Referência	0,305	
	GT + TT	27 (48,2)	29 (51,8)	56	0,85 (0,63-1,15)		
	TT	2 (28,6)	5 (71,4)	7	0,52 (0,16-1,68)		-
Modelo recessivo	GT + GG	121 (55,3)	98 (44,7)	219	Referência	0,272	-
rs307247 (PTH)							
Modelo codominante	AA	18 (45,0)	22 (55,0)	40	0,87 (0,59-1,29)	0,500	-
	AG	52 (51,5)	49 (48,5)	101	Referência		-
	GG	54 (62,1)	33 (37,9)	87	1,21 (0,94-1,55)	0,144	-
Modelo dominante	GG	54 (62,1)	33 (37,9)	87	1,25 (0,99-1,58)	0,061	1,10 (0,86-1,41)
	AG + AA	70 (49,6)	71 (50,4)	141	Referência		Referência
	AA	18 (45,0)	22 (55,0)	40	0,80 (0,55-1,15)		-
Modelo recessivo	AG + GG	106 (56,4)	82 (43,6)	188	Referência	0,226	-
rs694 (PTH)							
Modelo codominante	CC	19 (39,6)	29 (60,4)	48	0,72 (0,49-1,06)	0,100	-
	CT	63 (54,8)	52 (45,2)	115	Referência		-
	TT	42 (63,6)	24 (36,4)	66	1,16 (0,91-1,49)	0,234	-
Modelo dominante	TT	42 (63,6)	24 (36,4)	66	1,26 (0,99-1,60)	0,053	-
	CT + CC	82 (50,3)	81 (49,7)	163	Referência		-
	CC	19 (39,6)	29 (60,4)	48	0,68 (0,47-0,99)	0,043	0,71 (0,48-1,05)
Modelo recessivo	CT + TT	105 (58,5)	76 (42,0)	181	Referência		Referência
rs1801197 (CALCR)							
Modelo codominante	AA	43 (50,0)	43 (50,0)	86	0,82 (0,63-1,06)	0,131	-
	AG	63 (61,2)	40 (38,8)	103	Referência		-
	GG	19 (48,7)	20 (51,3)	39	0,79 (0,56-1,14)	0,211	-
Modelo dominante	AA	43 (50,0)	43 (50,0)	86	0,87 (0,67-1,12)	0,266	-
	AG + GG	82 (57,7)	60 (42,3)	142	Referência		-
	GG	19 (48,7)	20 (51,3)	39	0,87 (0,61-1,23)	0,425	-
Modelo recessivo	AG + AA	106 (56,1)	83 (43,9)	189	Referência		-

Negrito significa valores estatisticamente significantes.

Abreviaturas: FL±PNS, Fissura labial com ou sem fissura palatina não sindrômica; RP_c, razão de prevalência bruta; RP_a, razão de prevalência ajustada; IC 95%, intervalo de confiança de 95%.

*Para a realização da análise de regressão de Poisson múltipla, as variáveis independentes com p<0,20 no modelo univariado foram incluídas nos modelos múltiplos. A RP_a foi calculada com ajuste pelas seguintes variáveis independentes: sexo, modelo dominante para rs1544410 (VDR), modelo dominante para rs307247 (PTH) e modelo recessivo para rs694 (PTH).

5.3 ARTIGO 3

Explorando polimorfismos em genes codificadores de fatores de crescimento associados à fissura labiopalatina não-sindrômica e à agenesia dentária[‡]

Gabriela Fonseca-Souza

Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Estomatologia, Curitiba, Paraná, Brasil.

Vitória Somma Tessari

Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Estomatologia, Curitiba, Paraná, Brasil.

Rafaela Scariot

Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Estomatologia, Curitiba, Paraná, Brasil.

Christian Kirschneck

Universidade de Bonn, Departamento de Ortodontia, Bonn, Alemanha.

Ricardo D. Coletta

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Departamento de Diagnóstico Oral e Programa de Pós-graduação em Biologia Buco-Dental, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

Erika Calvano Küchler

Universidade de Bonn, Departamento de Ortodontia, Bonn, Alemanha.

Juliana Feltrin-Souza

Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Estomatologia, Curitiba, Paraná, Brasil.

[‡] Artigo aceito e publicado no periódico *Journal of Applied Oral Science*.

Fonseca-Souza G, Tessari VS, Scariot R, Kirschneck C, Coletta RD, Küchler EC, Feltrin-Souza J. Exploring polymorphisms in genes encoding growth factors associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate and tooth agenesis. *J Appl Oral Sci*. 2025 Mar 14;33:e20240501. doi: 10.1590/1678-7757-2024-0501.

Explorando polimorfismos em genes codificadores de fatores de crescimento associados à fissura labiopalatina não-sindrômica e à agenesia dentária

Resumo

Objetivo: Avaliar a associação entre fissura labial não-sindrômica com ou sem envolvimento de palato (FL±PNS) e agenesia dentária (AD), bem como a associação de ambas as condições com polimorfismos em genes codificadores de fatores de crescimento.

Metodologia: Este estudo transversal incluiu crianças com FL±PNS e um grupo controle de crianças sem FL±PNS. AD de dentes permanentes (excluindo terceiros molares) foi avaliada por meio de radiografias panorâmicas analisadas por um examinador treinado. No grupo com FL±PNS, foram consideradas apenas as agenesias localizadas fora da área da fissura. Os polimorfismos genéticos nos genes do Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (*TGFB1*) – rs1800470 e rs4803455 –, do Receptor do Fator de Crescimento Transformador Beta 2 (*TGFB2*) – rs3087465 e rs764522 –, do Fator de Crescimento Epidérmico (*EGF*) – rs4444903 e rs2237051 – e do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (*EGFR*) – rs2227983 – foram genotipados por PCR em tempo real com discriminação alélica, a partir de amostras de células da mucosa bucal. As associações foram testadas por meio de modelos de regressão de Poisson uni e multivariados (nível de significância de 5%).

Resultados: Foram incluídas 243 crianças – 127 com FL±PNS (idade média = $8,80 \pm 2,14$ anos) e 116 sem FL±PNS (idade média = $8,58 \pm 2,03$ anos). A frequência de AD foi maior no grupo com FL±PNS (23,8%) do que no grupo controle (6,2%) ($p < 0,01$). O polimorfismo rs2237051 no gene *EGF* foi significativamente associado à FL±PNS, independentemente das demais variáveis ($RP_a = 1,41$; $p = 0,042$). Em relação à AD, apenas a presença da fissura foi associada a uma maior prevalência da condição, independentemente das demais variáveis analisadas ($RP_a = 3,70$; $p = 0,001$). Não foram observadas associações entre a AD e os polimorfismos genéticos investigados. Quando a ocorrência conjunta de AD e FL±PNS foi considerada, observou-se uma associação limítrofe com o polimorfismo rs1800470 no gene *TGFB1* ($p = 0,06$).

Conclusão: FL±PNS foi associada à presença de AD fora da área da fissura. O polimorfismo rs2237051 no gene *EGF* foi associado à FL±PNS. Polimorfismos em genes codificadores de fatores de crescimento não foram associados à AD.

Palavras-chave: Fenda labial. Fissura palatina. Família de proteínas EGF. Fatores de Crescimento Transformadores. Anodontia.

Introdução

O desenvolvimento dos dentes e das estruturas faciais, incluindo o lábio e o palato, apresenta uma próxima relação, especialmente considerando o período de formação e a posição anatômica durante a embriogênese humana.¹ O palato primário, responsável pela formação do lábio superior e do processo alveolar dos incisivos superiores, é formado pela fusão dos processos nasais mediais e maxilares entre a quarta e a sexta semana do desenvolvimento embrionário. Subsequentemente, o palato secundário é formado entre a sétima e a décima segunda semana, por meio da fusão dos processos palatinos da maxila.^{1, 2} Enquanto os dentes decíduos iniciam seu desenvolvimento por volta da sexta semana, os dentes permanentes têm início aproximadamente na vigésima semana de vida intrauterina.³ Interrupções nesses processos podem resultar em fissura fissura labial não-sindrômica com ou sem envolvimento de palato (FL±PNS) e em anomalias dentárias, incluindo agenesia dentária (AD), dentes supranumerários, defeitos de desenvolvimento do esmalte, microdontia e taurodontismo.⁴

FL±PNS e a AD são consideradas as anomalias congênitas do desenvolvimento craniofacial mais frequentemente relatadas em humanos.⁵ Uma revisão sistemática prévia⁴ observou que indivíduos com fissuras orais apresentam uma chance quase 20 vezes maior de apresentar AD do que indivíduos não afetados, com prevalência variando entre 13,1% e 77,3%. Pacientes com FL±PNS podem apresentar AD tanto na região da fissura quanto fora dela. Na área da fissura, o dente mais frequentemente ausente é o incisivo lateral.^{6, 7} Nessa região, o próprio defeito da fissura, bem como traumas cirúrgicos podem comprometer o tecido mesenquimal e o suprimento sanguíneo necessários ao desenvolvimento dentário.⁸ Fora da região da fissura, observa-se mais comumente a ausência de segundos pré-molares.^{9, 10} A ocorrência de AD fora da fissura pode sugerir que essas anomalias craniofaciais compartilham do mesmo fator genético.⁵

Evidências de estudos com modelos animais e estudos genéticos em humanos vêm demonstrando o papel crucial dos fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador beta 1 (TGFB1) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), no desenvolvimento craniofacial, incluindo o fechamento do palato e o desenvolvimento dentário adequado.¹¹⁻¹⁸ O TGFB1 pertence a uma superfamília de proteínas secretadas que se ligam ao receptor do fator de crescimento transformador beta 2 (TGFB2),¹⁹ atuando na proliferação, diferenciação e crescimento celular em diversos tecidos, incluindo o tecido ósseo, epitelial e conjuntivo.¹⁴ Essa proteína e seu receptor exercem função durante o desenvolvimento do palato, atuando na

proliferação celular, crescimento e fusão processos palatinos.^{13, 17, 20} Durante todas as fases da odontogênese, o *TGFB1* também regula a proliferação celular, sendo expresso tanto no mesênquima quanto no epitélio oral.¹⁸

O EGF é um fator mitogênico que estimula a proliferação celular por meio da ligação ao seu receptor (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico – EGFR). Ambos os genes codificadores do EGF e do EGFR são expressos durante a palatogênese.¹² Estudos em animais demonstram que alterações na expressão dessas proteínas estão associadas a falhas na fusão dos processos palatinos.^{11, 16} Em relação ao desenvolvimento dentário, um estudo observou que o *EGF* é expresso na mandíbula antes do aparecimento da lâmina dentária, influenciando no desenvolvimento dessa estrutura.¹⁵ Além disso, o *EGF* parece inibir a diferenciação celular de odontoblastos e ameloblastos.²¹

Poucos estudos investigaram a associação de polimorfismos em genes codificadores de fatores de crescimento com fenótipos craniofaciais em humanos. Gerber et al.²² encontraram uma associação entre variações no tamanho dentário e os polimorfismos rs1800470 no *TGFB1* e rs4444903 no *EGF*. Kirschneck et al.²³ identificaram que o rs3087465, localizado na região promotora do gene *TGFBR2*, está associado ao retrognatismo mandibular.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a associação entre AD e FL±PNS e investigar se essas alterações craniofaciais estão associadas a polimorfismos genéticos nos genes *TGFB1* (rs4803455 e rs1800470), *TGFBR2* (rs764522 e rs3087465), *EGF* (rs4444903 e rs2237051) e *EGFR* (rs2227983).

Materias e Métodos

Aspectos éticos

Este estudo transversal com grupo de comparação foi descrito conforme o *checklist* STREGA – *Strengthening the Reporting of Genetic Association Study Statement Checklist*.²⁴ A pesquisa seguiu os princípios da Declaração de Helsinque e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (protocolo nº 5.100.185) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da área de Ciências da Saúde da Universidade Federal do

Paraná (protocolo nº 3.752.172), ambos sediados em Curitiba, Paraná, Brasil. O termo de assentimento das crianças e o termo de consentimento livre e esclarecido dos responsáveis legais foram devidamente obtidos.

Seleção da amostra

A amostra incluiu crianças de ambos os sexos, com idades entre 6 e 14 anos, sem histórico de extrações de dentes permanentes. Foram avaliados dois grupos: um grupo de crianças com FL±PNS (grupo FL±PNS) e um grupo controle composto por crianças sem FL±PNS (grupo controle). O grupo com FL±PNS foi recrutado no Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Labiopalatal (CAIF), em Curitiba, Paraná, Brasil, caracterizado por ser o primeiro centro integrado de tratamento de anomalias craniofaciais da região sul do país. O CAIF recebe pacientes de 18 estados brasileiros, oferecendo atendimento inter e multiprofissional, incluindo tratamento médico e odontológico, aconselhamento genético e assistência psicológica e social.²⁵ O grupo controle foi recrutado na clínica de Odontopediatria da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, Paraná, Brasil). Crianças com síndromes ou outras anomalias craniofaciais que não envolvessem fissuras orais, bem como anomalias dentárias não foram incluídas.

O grupo FL±PNS incluiu casos de fissura labial isolada (FL), fissura labial com envolvimento do processo alveolar (FLA) e fissura labiopalatina (FLP). A fissura palatina isolada (FP) é considerada uma malformação congênita distinta, com origem embriológica diferente da FL±PNS,²⁶ e, por isso, não foi incluída neste estudo. A classificação do tipo de fissura foi baseada em exame clínico e confirmada por prontuário médico. A coleta de dados foi realizada entre janeiro de 2022 e agosto de 2023.

O cálculo do tamanho amostral considerou dados prévios de associação entre fissuras e anomalias dentárias.⁴ A proporção estimada de anomalias dentárias entre indivíduos com fissura foi de 38,8%, estabeleceu-se poder estatístico de 80%, intervalo de confiança de 95% (IC95%) e razão de chances (*odds ratio* – OR) de 3,14. Para compensar possíveis perdas, houve acréscimo de 20% à amostra estimada. Assim, o tamanho final da amostra foi estimado entre 100 e 120 crianças por grupo.

Avaliação da Agenesia Dentária

Foram incluídos na avaliação pacientes com pelo menos uma radiografia panorâmica disponível. Uma única examinadora (G.F.S), cirurgiã-dentista, foi treinada para diagnosticar AD nas radiografias panorâmicas de ambos os grupos. A avaliação da AD de dentes permanentes (excluindo terceiros molares) foi realizada a partir de radiografias obtidas nos prontuários dos pacientes, sendo o diagnóstico definido com base na idade cronológica da criança e na expectativa de visualização da formação inicial dos germes dentários, conforme a cronologia de desenvolvimento dentário.²⁷

No grupo com FL±PNS, foram consideradas apenas as agenesias localizadas fora da área da fissura. Assim, em casos de FL unilateral ou bilateral, qualquer ausência de dentes permanentes foi considerada. Nos casos de FLA ou FLP direitas, todos os dentes permanentes foram considerados, exceto o incisivo lateral superior direito; para os casos FLA e FLP esquerdas, todos os dentes foram considerados, exceto o incisivo lateral superior esquerdo. Nos casos bilaterais de FLA ou FLP, ambos os incisivos laterais superiores foram desconsiderados. No grupo controle, considerou-se a ausência de qualquer dente permanente.

Todas as radiografias avaliadas apresentavam critérios de alta qualidade e foram analisadas digitalmente, em ambiente escuro, por um único examinador treinado. Quando mais de uma radiografia panorâmica estava disponível para a mesma criança, todas foram utilizadas para confirmação diagnóstica. A reprodutibilidade intraexaminador foi avaliada por meio da reanálise de dez radiografias panorâmicas selecionadas aleatoriamente, com intervalo de um mês entre as avaliações. O coeficiente Kappa indicou concordância perfeita entre os dois momentos ($\kappa = 1$).

Extração do DNA e genotipagem

Células da mucosa bucal foram obtidas com enxágue bucal utilizando 5 ml de solução salina. O DNA genômico foi extraído conforme o protocolo descrito por Küchler et al. (2012).²⁸ A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

Foram selecionados polimorfismos genéticos nos genes *TGFB1* (rs4803455 e rs1800470), *TGFBR2* (rs764522 e rs3087465), *EGF* (rs4444903 e rs2237051) e *EGFR* (rs2227983), possivelmente associados ao desenvolvimento craniofacial.^{9, 12, 13, 16, 17, 20, 21, 29-32} 10 Os polimorfismos genéticos foram escolhidos com base na frequência do alelo menor (>10%) e no seu possível impacto sobre os processos de palatogênese e odontogênese. Assim, partiu-se da hipótese de que esses genes desempenham um papel na odontogênese e que polimorfismos comuns poderiam estar envolvidos na ocorrência de AD. As características dos genes e dos polimorfismos selecionados estão descritas na Tabela 1.

Os testes de discriminação alélica foram realizados por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para genotipagem, utilizando o sistema *StepOnePlus Real-Time PCR* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A taxa de sucesso na genotipagem variou entre 97,2% e 99,5%.

Tabela 1. Características dos genes selecionados para o estudo.

Identificação do gene	Cromossomo	Função no desenvolvimento craniofacial	Polimorfismo Genético	Alteração de base	Função	Frequência do alelo menor
Fator de Crescimento Beta 1 (TGFB1)	19q13.2	• Atua na proliferação, crescimento celular e fusão dos processos palatinos. ^{13, 17}	rs4803455	C/A	Íntron	0,480
		• Regula a expressão do Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo, que participa da formação do palato secundário. ²⁰	rs1800470	A/G	Mutação do tipo <i>missense</i>	0,495
		• Regula a diferenciação de odontoblastos. ²⁹				
		• Regula a formação da raiz dentária. ³²				
Receptor do Fator de Crescimento Transformador Beta 2 (TGFB2)	3p24.1	• Atua na fusão dos processos palatinos. ³⁰	rs764522	C/G	Região a montante (<i>upstream</i>)	0,253
		• Regula a diferenciação dos odontoblastos. ³¹	rs3087465	A/G	Região a montante (<i>upstream</i>)	0,248
Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)	4q25	• Atua na fusão dos processos palatinos. ^{12, 16}	rs4444903	A/G	Transcrito não codificante	0,424
		• Expresso na mandíbula em desenvolvimento antes do surgimento da lâmina dentária, tendo função no desenvolvimento dentário. ¹⁵				
		• Inibe a morfogênese dentária e impede a diferenciação de odontoblastos e ameloblastos. ²¹	rs2237051	A/G	Mutação do tipo <i>missense</i>	0,412
Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)	7p11.2	• Participa do desenvolvimento craniofacial e do fechamento do palato. ¹⁶	rs2227983	A/G	Mutação do tipo <i>missense</i>	0,264
		• Expresso no epitélio e no mesênquima dentário durante os estágios iniciais da odontogênese. ²¹				

Nota: Obtido da base de dados: <http://www.thermofisher.com>.

Análise Estatística

A associação entre FL±PNS e AD foi analisada por meio do teste do qui-quadrado. Regressão de Poisson com variância robusta foi utilizada para avaliar a relação das variáveis dependentes FL±PNS e AD com as variáveis independentes “sexo” e “fenótipos relacionados aos genes codificadores de fatores de crescimento”. As variáveis FL±PNS e AD foram categorizadas de acordo com sua presença como “sim” ou “não”. Os genótipos foram analisados nos modelos aditivo, dominante e recessivo. Modelos múltiplos foram construídos utilizando o método *stepwise*, considerando as variáveis independentes com $p < 0,20$ no modelo univariado. Adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi avaliado para cada polimorfismo genético por meio do teste do qui-quadrado, utilizando a ferramenta online wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg, para a amostra total. Foram considerados desvios do EHW quando o valor de qui-quadrado foi superior a 3,84.

O potencial impacto funcional dos polimorfismos associados às variáveis dependentes foi estimado utilizando o *PolyPhen-2*,³³ uma ferramenta que prevê a probabilidade de uma variante afetar a função da proteína com base nos dados de sequência e estrutura proteica.

Resultados

Um total de 292 crianças foi inicialmente avaliado. Dessas, trinta e sete ($n=37$) foram excluídas pelos seguintes motivos: presença de síndromes ou outras anomalias craniofaciais que não envolviam fissura ($n=17$) e presença de fissura palatina isolada (FP) ($n=20$). Assim, duzentos e cinquenta e cinco ($n=255$) pacientes foram avaliados quanto à disponibilidade de amostras de DNA e radiografias panorâmicas. Dentre esses, 243 apresentaram amostras de DNA válidas e foram incluídos na análise de genotipagem para FL±PNS, sendo 127 pacientes com FL±PNS e 116 sem FL±PNS. Além disso, 216 pacientes apresentaram tanto DNA quanto radiografia panorâmica e foram incluídos na análise genética para AD (Figura 1). As características da população do estudo constam na Tabela 2.

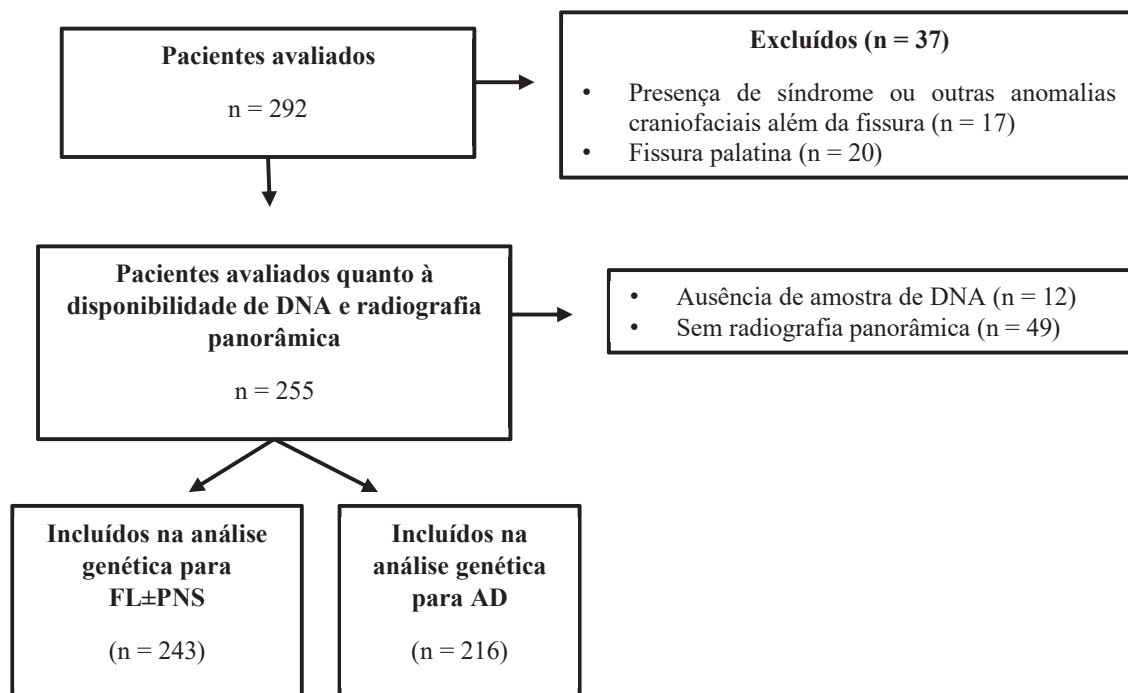


Figura 1 – Seleção dos participantes do estudo.

A AD foi significativamente mais frequente no grupo com FL±PNS (23,8%) em comparação ao grupo controle (6,2%) ($p < 0,01$). Na amostra, os dentes mais acometidos por AD foram os incisivos laterais superiores (considerando-se apenas os localizados fora da área da fissura no grupo com FL±PNS) e os segundos pré-molares superiores e inferiores. A ausência de segundos pré-molares superiores foi observada apenas no grupo com FL±PNS ($n = 17$). Dois pacientes do grupo com FL±PNS apresentaram mais de uma agenesia dentária (Tabela 2).

Tabela 2. Características da população de estudo de acordo com os grupos (Curitiba, Paraná, Brazil, $n = 243$, 2024)*.

Variáveis	Categorias	Grupo n (%)		Valor de p
		FL±PNS (n=127)	Controle (n=116)	
Tipo de fissura	FL	42 (33,1)	-	-

	FLP		85 (66,9)	-	-
Sexo	Feminino		52 (40,9)	64 (55,2)	0,027
	Masculino		75 (59,1)	52 (44,8)	
Idade (anos)	Média (DP)		8,80 (2,14)	8,58 (2,03)	0,385**
AD	Um ou mais dentes	Sim	25 (23,8)	7 (6,2)	<0,01
		Não	80 (76,2)	105 (93,8)	
	ILS	Sim	5 (4,8)	3 (2,7)	0,326*
		Não	100 (95,2)	109 (97,3)	
	2º PMS	Sim	17 (16,2)	0 (0,0)	<0,01*
		Não	88 (83,8)	112 (100)	
	2º PMSI	Sim	5 (4,8)	4 (3,6)	0,460*
		Não	100 (95,2)	108 (96,4)	

Negrito significa valores estatisticamente significantes.

Abreviaturas: FL±PNS, fissura labial com ou sem fissura palatina não sindrômica; FL, fissura labial isolada; FP, fissura palatina; AD, agenesia dentária; ILS, incisivo lateral superior; 2ºPMS, segundo pré-molar superior; 2ºPMI, segundo pré-molar inferior; DP, desvio padrão.

AD: 216 pacientes apresentaram radiografia panorâmica e foram avaliados em relação à presença de AD.

Valor de p: teste chi-quadrado, *Teste exato de Fisher, **Teste U de Mann-Whitney U.

Na análise univariada, ao se considerar a associação entre FL±PNS e as variáveis independentes, observou-se uma associação significativa entre a presença da fissura e o sexo ($RP_c = 1,35$; $p = 0,016$), com maior prevalência de FL±PNS em indivíduos do sexo masculino (60,2%) em comparação aos do sexo feminino (44,6%) (Tabela 3). Na análise multivariada, o polimorfismo rs2237051 no gene *EGF* apresentou associação significativa com FL±PNS, independentemente das demais variáveis ($RP_a = 1,41$; $p = 0,042$). Indivíduos portadores de pelo menos um alelo A (AA/AG) apresentaram menor prevalência de FL±PNS em comparação aos indivíduos com o genótipo GG (Tabela 3). A análise de predição bioinformática para o rs2237051 indicou que esse polimorfismo provavelmente não afeta a função da proteína, sendo classificado como de impacto benigno.

Em relação aos dados de AD, apenas a presença da fissura esteve associada a uma maior prevalência desta anomalia dentária, independentemente das demais variáveis ($RP_a = 3,70$; $p = 0,001$). Não foi observada associação entre AD e os polimorfismos genéticos investigados (Tabela 4). Apenas o polimorfismo rs1800470 no gene *TGFB1* apresentou uma associação limítrofe com a presença de AD quando considerada também a presença da fissura ($p = 0,065$).

Tabela 3. Razão de prevalência de FL±PNS segundo as características da amostra e os genótipos dos genes codificadores de fatores de crescimento (Curitiba, Paraná, Brasil, n=217, 2024).

Variável	Categoria	FL±PNS		RP _c (IC 95%)	Valor de p	RP _a (IC 95%)*
Sexo	Feminino	Sim n (%)	Não n (%)	Referência	0,016	Referência 1,23 (0,96-1,57)
	Masculino	80 (60,2)	53 (39,8)	1,35 (1,06-1,72)		
rs4803455 (TGFB1)						
Modelo aditivo	CC	44 (50,0)	44 (50,0)	0,93 (0,71-1,21)	0,583	-
	AA	18 (56,2)	14 (43,8)	1,04 (0,74-1,48)	0,812	-
	CA	62 (53,9)	53 (46,1)	Referência		-
Modelo dominante	CC	44 (50,0)	44 (50,0)	0,91 (0,71-1,19)	0,516	-
	CA + AA	80 (54,4)	67 (45,6)	Referência		-
Modelo recessivo	AA	18 (56,2)	14 (43,8)	1,07 (0,77-1,50)	0,661	-
	CA + CC	106 (52,2)	97 (47,8)	Referência		-
rs1800470 (TGFB1)						
Modelo aditivo	AA	31 (59,6)	21 (40,4)	1,13 (0,85-1,49)	0,397	-
	GG	29 (46,8)	33 (53,2)	0,88 (0,64-1,21)	0,446	-
	AG	65 (52,8)	58 (47,2)	Referência		-
Modelo dominante	GG	29 (46,8)	33 (53,2)	0,85 (0,63-1,15)	0,294	-
	AG + AA	96 (54,9)	79 (45,1)	Referência		-
Modelo recessivo	AA	31 (59,6)	21 (40,4)	1,17 (0,90-1,53)	0,237	-
	AG + GG	95 (50,8)	91 (49,2)	Referência		-
rs764522 (TGFB2)						
Modelo aditivo	CC	77 (52,4)	70 (47,6)	Referência		-
	GG	5 (45,5)	6 (54,5)	0,87 (0,45-1,69)	0,676	-
	GG	44 (55,7)	35 (44,3)	1,06 (0,83-1,36)	0,630	-
Modelo dominante	CC	77 (52,4)	70 (47,6)	Referência	0,756	-
	CG + GG	49 (54,4)	41 (45,6)	1,04 (0,81-1,33)		-
Modelo recessivo	GG	5 (45,5)	6 (54,5)	0,85 (0,44-1,64)	0,626	-
	CG + CC	121 (53,5)	105 (46,5)	Referência		-
rs3087465 (TGFB2)						
Modelo aditivo	AA	8 (33,3)	16 (66,7)	0,59 (0,33-1,07)	0,082	-
	GG	63 (56,2)	49 (43,8)	Referência		-
	AG	54 (54,0)	46 (46,0)	0,96 (0,75-1,22)	0,743	-
Modelo dominante	GG	63 (56,2)	49 (43,8)	1,12 (0,88-1,43)	0,336	-
	AG + AA	62 (50,0)	62 (50,0)	Referência		-
Modelo recessivo	AA	8 (33,3)	16 (66,7)	0,60 (0,34-1,08)	0,088	0,64 (0,36-1,13)
	AG + GG	117 (55,2)	95 (44,8)	Referência		Referência
rs4444903 (EGF)						
Modelo aditivo	AA	36 (59,0)	25 (41,0)	1,17 (0,89-1,54)	0,259	-

Variável	Categoria	FL±PNS		RP _c (IC 95%)	Valor de p	RP _a (IC 95%)*
		Sim n (%)	Não n (%)			
Modelo dominante	GG	28 (48,3)	30 (51,7)	0,96 (0,70-1,32)	0,791	-
	AG	61 (50,4)	60 (49,6)	Referência		-
	AA	36 (59,0)	25 (41,0)	1,19 (0,92-1,53)		0,93 (0,65-1,31)
	AG + GG	89 (49,7)	90 (50,3)	Referência	0,189	Referência
Modelo recessivo	GG	28 (48,3)	30 (51,7)	0,91 (0,67-1,22)		-
	AG + AA	97 (53,3)	85 (46,7)	Referência	0,517	-
rs2237051 (EGF)						
Modelo aditivo	AA	26 (49,1)	27 (50,9)	1,01 (0,72-1,40)	0,971	-
	GG	42 (61,8)	26 (38,2)	1,27 (0,97-1,64)	0,076	-
	AG	59 (48,8)	62 (51,2)	Referência		-
Modelo dominante	GG	42 (61,8)	26 (38,2)	1,26 (0,99-1,61)		1,41 (1,01-1,95)
	AG + AA	85 (48,9)	89 (51,1)	Referência	0,056	Referência
Modelo recessivo	AA	26 (49,1)	27 (50,9)	0,92 (0,68-1,24)		-
	AG + GG	101 (53,4)	88 (46,6)	Referência	0,582	-
rs227983 (EGFR)						
Modelo aditivo	AA	10 (55,6)	8 (44,4)	1,06 (0,68-1,65)	0,801	-
	GG	74 (52,5)	67 (47,5)	Referência		-
	AG	42 (52,5)	38 (47,5)	1,00 (0,77-1,30)	0,998	-
Modelo dominante	GG	74 (52,5)	67 (47,5)	Referência		-
	AG + AA	52 (53,1)	46 (46,9)	1,01 (0,79-1,29)	0,930	-
Modelo recessivo	AA	10 (55,6)	8 (44,4)	1,06 (0,69-1,63)		-
	AG + GG	116 (52,5)	105 (47,5)	Referência	0,797	-

Negrito significa valores estatisticamente significantes.

Abreviaturas: FL±PNS, Fissura labial com ou sem fissura palatina não sindrômica; RP_c, razão de prevalência bruta; RP_a, razão de prevalência ajustada; IC 95%, intervalo de confiança de 95%.

*Para a realização da análise de regressão de Poisson múltipla, as variáveis independentes com p<0,20 no modelo univariado foram incluídas nos modelos múltiplos. A RP_a foi calculada com ajuste pelas seguintes variáveis independentes: sexo, modelo dominante para o polimorfismo rs444903 (EGF) e modelo dominante para o polimorfismo rs2237051 (EGF).

Tabela 4. Razão de prevalência de AD segundo as características da amostra e os genótipos dos genes codificadores de fatores de crescimento (Curitiba, Paraná, Brasil, n=217, 2024).

Variável	Categorias	AD		RP _c (IC 95%)	Valor de P	RP _a (IC 95%)*
FL±PNS	Sim	25 (23,8)	Não n (%) 80 (76,2)	3,81 (1,72–8,43)	0,001	3,70 (1,67–8,20) Referência
	Não	7 (6,2)	105 (93,8)	Referência		
	Feminino	17 (16,7)	85 (83,3)	1,29 (0,67-2,43)		
	Masculino	15 (13,0)	100 (87,0)	Referência		
rs4803455 (TGFB1)						
Modelo aditivo	CC	14 (18,9)	60 (81,1)	1,35 (0,69-2,66)	0,383	-
	AA	2 (7,7)	24 (92,3)	0,55 (0,13-2,27)	0,408	-
	CA	14 (14,0)	86 (86,0)	Referência	0,383	-
Modelo dominante	CC	14 (18,6)	60 (81,1)	1,49 (0,77-2,87)	0,235	-
	CA + AA	16 (12,7)	110 (87,3)	Referência		-
	AA	2 (7,7)	24 (92,3)	0,48 (0,12-1,89)		-
Modelo recessivo	CA + CC	28 (16,1)	146 (83,9)	Referência	0,292	-
rs1800470 (TGFB1)						
Modelo aditivo	AA	5 (12,2)	36 (87,8)	0,95 (0,36-2,47)	0,915	-
	GG	11 (21,2)	41 (78,8)	1,65 (0,80-3,37)	0,173	-
	AG	14 (12,8)	95 (87,2)	Referência	0,135	1,83 (0,96-3,50) Referência
Modelo dominante	GG	11 (21,2)	41 (78,8)	1,67 (0,85-3,27)		
	AG + AA	19 (12,7)	131 (87,3)	Referência		
Modelo recessivo	AA	5 (12,2)	36 (87,8)	0,78 (0,32-1,93)	0,598	-
	AG + GG	25 (15,5)	136 (84,5)	Referência		-
rs764522 (TGFB2)						
Modelo aditivo	CC	18 (15,0)	102 (85,0)	Referência	-	-
	GG	0 (0,0)	11 (100,0)	-		-
	CG	11 (15,5)	60 (85,0)	1,03 (0,52-2,06)		0,927
Modelo dominante	CC	18 (15,0)	102 (85,0)	Referência	0,753	-
	CG + GG	11 (13,4)	71 (86,6)	0,89 (0,45-1,79)		-
	GG	0 (0,0)	11 (100,0)	-		-
Modelo recessivo	CG + CC	29 (15,2)	162 (84,8)	Referência	-	-
rs3087465 (TGFB2)						
Modelo aditivo	AA	1 (4,5)	21 (95,5)	0,26 (0,04-1,87)	0,181	-
	GG	16 (17,4)	76 (82,6)	Referência	0,531	-
	AG	12 (14,0)	74 (86,0)	0,80 (0,40-1,60)		-
Modelo dominante	GG	16 (17,4)	76 (82,6)	1,44 (0,73-2,84)		0,287
	AG + AA	13 (12,0)	95 (88,0)	Referência	-	
	AA	1 (4,5)	21 (95,5)	0,29 (0,04-2,02)	-	
Modelo recessivo	AG + GG	28 (17,7)	150 (84,3)	Referência	0,211	-
rs444903 (EGF)						
Modelo aditivo	AA	6 (11,8)	45 (88,2)	0,73 (0,30-1,73)	0,471	-

Variável	Categorias	AD			Valor de P	RP _a (IC 95%)*
		Sim n (%)	Não n (%)	RP _c (IC 95%)		
Modelo dominante	GG	7 (14,6)	41 (85,4)	0,90 (0,40-2,03)	0,801	-
	AG	17 (16,2)	88 (83,8)	Referência	0,471	-
	AA	6 (11,8)	45 (88,2)	0,75 (0,32-1,73)		-
	AG + GG	24 (15,7)	129 (84,3)	Referência	0,500	-
	GG	7 (14,6)	41 (85,4)	0,99 (0,45-2,16)		-
Modelo recessivo	AG + AA	23 (14,7)	133 (85,3)	Referência	0,978	-
rs2237051 (EGF)						
Modelo aditivo	AA	6 (13,0)	40 (87,0)	0,77 (0,33-1,84)	0,563	-
	GG	7 (12,1)	51 (87,9)	0,72 (0,32-1,63)	0,426	-
	AG	17 (16,8)	84 (83,2)	Referência	0,563	-
Modelo dominante	GG	7 (12,1)	51 (87,9)	0,77 (0,35-1,70)		-
	AG + AA	23 (15,6)	124 (84,4)	Referência	0,519	-
Modelo recessivo	AA	6 (13,0)	40 (87,0)	0,86 (0,38-1,99)		-
	AG + GG	24 (15,1)	135 (84,9)	Referência	0,731	-
rs2227983 (EGFR)						
Modelo aditivo	AA	1 (5,9)	16 (94,1)	0,41 (0,06-2,92)	0,377	-
	GG	17 (14,2)	103 (85,8)	Referência		-
	AG	12 (18,2)	54 (81,8)	1,28 (0,65-2,52)	0,469	-
Modelo dominante	GG	17 (14,2)	103 (85,8)	Referência		-
	AG + AA	13 (15,7)	70 (84,3)	1,10 (0,57-2,15)	0,768	-
Modelo recessivo	AA	1 (5,9)	16 (94,1)	0,38 (0,05-2,60)		-
	AG + GG	29 (15,6)	157 (84,4)	Referência	0,322	-

Negrito significa valores estatisticamente significantes.

Abreviaturas: AD, Agenesia dentária; FL±PNS, Fissura labial com ou sem fissura palatina; RP_c, razão de prevalência bruta; RP_a, razão de prevalência ajustada; IC 95%, intervalo de confiança de 95%

Para a realização da análise de regressão de Poisson múltipla, as variáveis independentes com p<0,20 no modelo univariado foram incluídas nos modelos múltiplos RP_a foi ajustada pelas seguintes variáveis independentes: presença de FL±PNS e modelo dominante para o polimorfismo rs1800470 (*TGFB1*).

Discussão

O desenvolvimento craniofacial e a odontogênese são processos complexos e inter-relacionados, coordenados e regulados por diversos fatores genéticos.¹⁰ Alterações nesses processos podem resultar em anomalias nas estruturas orofaciais e dentárias, como a FL±PNS e a AD.³⁴ Neste estudo, indivíduos com FL±PNS apresentaram uma prevalência de AD 270% maior fora da área da fissura, corroborando com estudos anteriores em diferentes populações.^{6, 7, 9, 10, 35} Na Holanda, Bartzela et al. (2023)⁷ observaram que a AD fora da área da fissura estava presente em 20,9% dos pacientes com FL±PNS unilateral. Mangione et al.⁶ identificaram que 54,7% dos pacientes franceses com fissuras orais apresentavam AD fora da área da fissura. Na população brasileira, a prevalência relatada de AD fora da região fissurada varia de 28,6% a 47,5%.^{9, 10, 35}

Neste estudo, apenas os casos de AD ocorrendo fora da área da fissura foram considerados, ou seja, não foram incluídas agenesias de incisivos laterais localizados dentro da área fissurada. Em humanos, os incisivos laterais são frequentemente afetados por anomalias de desenvolvimento. Os processos nasais mediais e maxilares, responsáveis pela formação do lábio superior e rebordo alveolar, fornecem os tecidos para a formação dos incisivos laterais. Assim, falhas na fusão desses processos podem ser um fator local associado à agenesia desses dentes.¹ A AD, por sua vez, localizada fora da região da fissura pode indicar que essa anomalia dentária compartilha uma base genética semelhante à das fissuras orofaciais.

No presente estudo, indivíduos com o genótipo GG para o polimorfismo rs2237051 no gene *EGF* apresentaram uma prevalência estatisticamente maior de FL±PNS em comparação aos indivíduos com os genótipos AA/AG. Esse polimorfismo é uma variante do tipo *missense*, resultando em uma substituição conservadora do aminoácido metionina por isoleucina na posição 708 da proteína, o que geralmente não afeta sua função. A análise preditiva por bioinformática utilizando o *PolyPhen-2*³³ indicou que essa variante tem baixo potencial de impacto funcional. No entanto, mesmo substituições conservadoras podem influenciar propriedades bioquímicas da proteína, como a cinética enzimática ou a estabilidade estrutural, sem eliminar completamente a sua função.³⁶ A literatura aponta que o *EGF* é necessário para o crescimento e diferenciação de células epiteliais, incluindo a degeneração das células epiteliais durante a fusão dos processos palatinos na formação do palato secundário.^{12, 16} Assim, é possível sugerir que alterações nesse gene possam comprometer o desenvolvimento adequado do palato, resultando em FL±PNS. Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a

investigar a associação desse polimorfismo com alterações no desenvolvimento craniofacial, destacando a importância de estudos futuros em diferentes populações.

Nenhuma associação foi observada entre FL±PNS e o polimorfismo rs4444903, o que é consistente com achados prévios em estudo realizado também na população brasileira.³⁷ Por outro lado, uma pesquisa em população chinesa³⁸ encontrou associação protetiva do genótipo GA para esse mesmo polimorfismo. Sabe-se que a expressividade de variantes genéticas pode ser influenciada por fatores ambientais, levando a uma ampla variedade de fenótipos em diferentes indivíduos e populações,³⁹ que pode explicar os achados divergentes entre os estudos.

A AD não foi associada aos polimorfismos genéticos avaliados. Apenas o polimorfismo rs1800470 no gene *TGFBI* apresentou uma associação limítrofe com a presença de AD, quando considerada também a presença da fissura. Durante a odontogênese, o *TGFBI* regula a diferenciação de odontoblastos,²⁹ e a formação radicular.³² O rs1800470 é uma mutação *missense* não conservadora, onde ocorre a substituição do nucleotídeo citosina por timina. Estudos anteriores em humanos relacionaram esse polimorfismo à diminuição do tamanho dentário.²² Como a AD e a redução do tamanho dos dentes podem compartilhar mecanismos genéticos semelhantes,⁴⁰ isso pode justificar os achados do presente estudo. No entanto, essa associação limítrofe deve ser interpretada com cautela, visto o tamanho amostral limitado. Estudos com amostras maiores são necessários para confirmar o possível papel desse polimorfismo na ocorrência de AD.

Estudos em animais sugerem que os genes *TGFBR2* e *EGFR* participam do desenvolvimento craniofacial, sendo expressos durante a palatogênese^{16, 30, 41} nos estágios iniciais da odontogênese.^{21, 42} Em humanos, mutações no *TGFBR2* estão associadas à síndrome de Loeys-Dietz, caracterizada pela tríade de hipertelorismo, fissura palatina ou úvula bífida, aneurismas arteriais e tortuosidade vascular.⁴³ Além disso, o polimorfismo rs3087465 nesse gene já foi associado ao retrognatismo mandibular.²³ No entanto, As evidências envolvendo *EGFR* em humanos são ainda escassas e contraditórias.⁴⁴ No presente estudo, nenhum dos polimorfismos avaliados em *TGFBR2* e *EGFR* mostrou associação com FL±PNS ou AD. Novas investigações são necessárias para elucidar o papel desses genes nas malformações craniofaciais.

Uma revisão sistemática prévia⁵ demonstrou que genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial, como *MSX1*, *PAX9* e *IRF6*, também estão implicados na coocorrência de fissuras e AD em humanos. No entanto, devido à baixa ocorrência de AD no grupo sem FL±PNS, não

foi possível avaliar essa coocorrência na análise genética do presente estudo, o que representa uma limitação.

Estudos com pacientes com FL±PNS enfrentam muitos desafios metodológicos, pois os participantes geralmente são recrutados em centros especializados, resultando em amostras de conveniência com tamanho limitado. Considerando a imprevisibilidade na frequência dos polimorfismos genéticos analisados, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado para detectar possíveis desequilíbrios. Ainda assim, o poder estatístico para as comparações envolvendo os polimorfismos variou substancialmente. Por outro lado, o objetivo principal do estudo – avaliar a associação entre FL±PNS e AD – apresentou alto poder estatístico. É importante destacar que o estudo foi realizado em uma população específica, o que pode limitar a generalização dos resultados para outras populações. Isso reforça a necessidade de novas pesquisas bem delineadas para explorar os fatores genéticos associados aos fenótipos dentários em indivíduos com FL±PNS.

Os achados deste estudo contribuem para uma compreensão mais abrangente dos fatores genéticos e fenótipos relacionados às alterações craniofaciais. Considerando que o tipo de fissura e a localização da AD podem impactar os resultados, foram excluídos indivíduos com FP, devido à sua origem embriológica distinta, e não foi considerada a AD na região da fissura, evitando viés nos achados. Além disso, o grupo controle foi recrutado de uma população semelhante à dos indivíduos com FL±PNS, permitindo comparações mais precisas.

A alta prevalência de AD em indivíduos com FL±PNS reforça a importância da avaliação e intervenção odontológica precoce nesses pacientes. Ademais, compreender os fatores genéticos envolvidos nessas condições pode permitir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais personalizadas, possibilitando a identificação de pacientes com maior risco de anomalias dentárias e aprimorando o cuidado de indivíduos com alterações craniofaciais.

Conclusão

Com base nos achados desta população, conclui-se que a FL±PNS está significativamente associada à AD fora da área da fissura e ao polimorfismo rs2237051 no gene *EGF*, enquanto os polimorfismos avaliados nos genes *TGFB1*, *TGFBR2*, *EGF* e *EGFR* não foram associados à AD.

Referências

1. Hovorakova M, Lesot H, Peterka M, Peterkova R. Early development of the human dentition revisited. *J Anat.* 2018;233(2):135-45.
2. Clark MB, Clark DA. Oral Development and Pathology. *Ochsner J.* 2018;18(4):339-44.
3. Husain MA. Dental Anatomy and Nomenclature for the Radiologist. *Radiol Clin North Am.* 2018;56(1):1-11.
4. Fonseca-Souza G, de Oliveira LB, Wambier LM, Scariot R, Feltrin-Souza J. Tooth abnormalities associated with non-syndromic cleft lip and palate: systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2022;26(8):5089-103.
5. Phan M, Conte F, Khandelwal KD, Ockeloen CW, Bartzela T, Kleefstra T, et al. Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arms? *Hum Genet.* 2016;135(12):1299-327.
6. Mangione F, Nguyen L, Fomou N, Bocquet E, Dursun E. Cleft palate with/without cleft lip in French children: radiographic evaluation of prevalence, location and coexistence of dental anomalies inside and outside cleft region. *Clin Oral Investig.* 2018;22(2):689-95.
7. Bartzela TN, Carels CE, Bronkhorst EM, Kuijpers-Jagtman AM. Tooth agenesis patterns in unilateral cleft lip and palate in humans. *Arch Oral Biol.* 2013;58(6):596-602.
8. Korolenkova MV, Starikova NV, Udalova NV. The role of external aetiological factors in dental anomalies in non-syndromic cleft lip and palate patients. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2019;20(2):105-11.
9. Sá J, Mariano LC, Canguçu D, Coutinho TS, Hoshi R, Medrado AP, et al. Dental Anomalies in a Brazilian Cleft Population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2016;53(6):714-9.
10. Kuchler 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.
11. Barrio MC, Del Río A, Murillo J, Maldonado E, López-Gordillo Y, Paradas-Lara I, et al. Epidermal growth factor impairs palatal shelf adhesion and fusion in the Tgf- β 3 null mutant. *Cells Tissues Organs.* 2014;199(2-3):201-11.
12. Iamaroon A, Tait B, Diewert VM. Cell proliferation and expression of EGF, TGF- α , and EGF receptor in the developing primary palate. *J Dent Res.* 1996;75(8):1534-9.
13. Ito Y, Yeo JY, Chytil A, Han J, Bringas P, Jr., Nakajima A, et al. Conditional inactivation of Tgfbr2 in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development.* 2003;130(21):5269-80.
14. Krivicka B, Pilmane M, Akota I. Expression of growth factors and growth factor receptors in human cleft-affected tissue. *Stomatologija.* 2013;15(4):111-8.
15. Kronmiller JE. Spatial distribution of epidermal growth-factor transcripts and effects of exogenous epidermal growth factor on the pattern of the mouse dental lamina. *Arch Oral Biol.* 1995;40(2):137-43.
16. Miettinen PJ, Chin JR, Shum L, Slavkin HC, Shuler CF, Derynck R, et al. Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nat Genet.* 1999;22(1):69-73.

17. Yapijakis C, Davaria S, Gintoni I, Chrousos GP. The Impact of Genetic Variability of TGF-Beta Signaling Biomarkers in Major Craniofacial Syndromes. *Adv Exp Med Biol.* 2023;1423:187-91.
18. Zhang W, Qu HC, Zhang Y. Association of MSX1 and TGF- β 1 genetic polymorphisms with hypodontia: meta-analysis. *Genet Mol Res.* 2014;13(4):10007-16.
19. Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(3):169-78.
20. Tarr JT, Lambi AG, Bradley JP, Barbe MF, Popoff SN. Development of Normal and Cleft Palate: A Central Role for Connective Tissue Growth Factor (CTGF)/CCN2. *J Dev Biol.* 2018;6(3).
21. Partanen AM, Ekblom P, Thesleff I. Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. *Dev Biol.* 1985;111(1):84-94.
22. Gerber JT, Dos Santos KM, Brum BK, Petinati MFP, Meger MN, da Costa DJ, et al. Odontogenesis-related candidate genes involved in variations of permanent teeth size. *Clin Oral Investig.* 2021;25(7):4481-94.
23. Kirschneck M, Zbidat N, Paddenbergen E, Reis CLB, Madalena IR, de Menezes-Oliveira MAH, et al. Transforming Growth Factor Beta Receptor 2 (TGFB2) Promoter Region Polymorphisms May Be Involved in Mandibular Retrognathism. *Biomed Res Int.* 2022;2022:1503052.
24. Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, et al. Strengthening of Reporting of Genetic Association Studies (STREGA)--an extension of the STROBE statement. *Genet Epidemiol.* 2009;33(7):581-98.
25. Baltazar MdM, Lima DP, Matos FGdO, Calixto RD, Moraes RSd, Fidalsk SZK. Atenção à Saúde a Pacientes Fissurados Labiopalatais no Estado do Paraná. In: Ditterich RG, Graziani GF, Moysés SJ, editors. *Caminhos e Trajetórias da Saúde Bucal no Estado do Paraná.* Londrina: iNESCO; 2019. p. 213-40.
26. Martinelli M, Palmieri A, Carinci F, Scapoli L. Non-syndromic Cleft Palate: An Overview on Human Genetic and Environmental Risk Factors. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:592271.
27. Kuchler EC, Risso PA, Costa Mde C, Modesto A, Vieira AR. Studies of dental anomalies in a large group of school children. *Arch Oral Biol.* 2008;53(10):941-6.
28. Kuchler EC, Tannure PN, Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Granjeiro JM, Amorim LM. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(4):467-71.
29. Bai Y, Cheng X, Liu X, Guo Q, Wang Z, Fu Y, et al. Transforming growth factor- β 1 promotes early odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via activating AKT, Erk1/2 and p38 MAPK pathways. *J Dent Sci.* 2023;18(1):87-94.
30. Xu X, Han J, Ito Y, Bringas P, Jr., Urata MM, Chai Y. Cell autonomous requirement for Tgfb2 in the disappearance of medial edge epithelium during palatal fusion. *Dev Biol.* 2006;297(1):238-48.

31. Yu C, Wu D, Zhao C, Wu C. CircRNA TGFB2/MiR-25-3p/TWIST1 axis regulates osteoblast differentiation of human aortic valve interstitial cells. *J Bone Miner Metab.* 2021;39(3):360-71.
32. Zhang R, Lin J, Liu Y, Yang S, He Q, Zhu L, et al. Transforming growth factor- β signaling regulates tooth root dentinogenesis by cooperation with Wnt signaling. 2021;9:687099.
33. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-9.
34. Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M, John N, Sommer L, Graf D, et al. The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2011;121(7-8):636-46.
35. Paranaíba LMR, Coletta RD, Swerts MSO, Quintino RP, De Barros LM, Martelli-Júnior HJTCP-CJ. Prevalence of dental anomalies in patients with nonsyndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. 2013;50(4):400-5.
36. Zhang Z, Miteva MA, Wang L, Alexov E. Analyzing effects of naturally occurring missense mutations. *Comput Math Methods Med.* 2012;2012:805827.
37. Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Küchler EC, Tannure PN, Costa Mde C, Amorim LM, et al. The functional EGF+61 polymorphism and nonsyndromic oral clefts susceptibility in a Brazilian population. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(4):390-6.
38. Yan J, Song H, Mi N, Jiao X, Hao Y. Nucleotide variants of the NAT2 and EGF61 genes in patients in Northern China with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(37):e7973.
39. Kingdom R, Wright CF. Incomplete Penetrance and Variable Expressivity: From Clinical Studies to Population Cohorts. *Front Genet.* 2022;13:920390.
40. Herrmann S, Küchler EC, Reis CLB, Paddenberg E, Zbidat N, Mattos NHR, et al. Association of third molar agenesis and microdontia with genetic polymorphisms in vitamin-D-related genes. *Ann Anat.* 2022;244:151972.
41. Fujino M, Osumi N, Ninomiya Y, Iseki S, Shibasaki Y, Eto K. Disappearance of epidermal growth factor receptor is essential in the fusion of the nasal epithelium. *Anat Sci Int.* 2003;78(1):25-35.
42. Li S, Pan Y. Differential expression of transforming growth factor-beta1, connective tissue growth factor, phosphorylated-SMAD2/3 and phosphorylated-ERK1/2 during mouse tooth development. *J Mol Histol.* 2017;48(5-6):347-55.
43. Schepers D, Tortora G, Morisaki H, MacCarrick G, Lindsay M, Liang D, et al. A mutation update on the LDS-associated genes TGFB2/3 and SMAD2/3. *Hum Mutat.* 2018;39(5):621-34.
44. Young DL, Schneider RA, Hu D, Helms JA. Genetic and teratogenic approaches to craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):304-17.

5.4 ARTIGO 4

Polimorfismos genéticos e variações na idade dentária em crianças com fissura labiopalatina não-sindrômica: Um estudo transversal[§]

Gabriela Fonseca-Souza¹

Lhorrany Alves-Souza²

Maria Angélica Hueb de Menezes-Oliveira²

Nikolaos Daratsianos³

Svenja Beisel-Memmert³

Christian Kirschneck³

Juliana Feltrin-Souza¹

Erika Calvano Küchler³

¹ Departamento de Estomatologia da Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothário Meissner 632, Jardim Botânico, Curitiba, Paraná, 80210-170, Brasil.

² Departamento de Biomateriais, Universidade de Uberaba, Av. Nenê Sabino 1801, Bairro Universitário, Uberaba, Minas Gerais, 38055-500, Brasil.

³ Departamento de Ortodontia, Hospital Universitário de Bonn, Faculdade de Medicina, Welschnonnenstr. 17, 53111, Bonn, Alemanha.

[§] Artigo aceito e publicado no periódico *BMC Pediatrics*.

Fonseca-Souza G, Alves-Souza L, de Menezes-Oliveira MAH, Daratsianos N, Beisel-Memmert S, Kirschneck C, Scariot R, Feltrin-Souza J, Küchler EC. Polymorphisms and dental age in non-syndromic cleft lip and palate: a cross-sectional study. *BMC Pediatr*. 2025 Jan 30;25(1):80. doi: 10.1186/s12887-025-05444-8. PMID: 39885448; PMCID: PMC11783813

Polimorfismos genéticos e variações na idade dentária em crianças com fissura labiopalatina não-sindrômica: Um estudo transversal

Resumo

Introdução: Crianças com fissura labial com ou sem acometimento de palato não-sindrômica (FL±PNS) podem apresentar alterações no desenvolvimento dentário. O objetivo deste estudo transversal foi comparar a idade dentária (ID) entre crianças com e sem FL±PNS e verificar se polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes codificadores de fatores de crescimento estão associados a variações na ID.

Métodos: Crianças entre 5 e 14 anos, com e sem FL±PNS, foram recrutadas para este estudo. A ID foi avaliada por examinadores calibrados ($\kappa > 0,80$), utilizando o método proposto por Demirjian et al. (1973). O DNA genômico foi extraído de células bucais, e os SNPs nos genes do Fator de Crescimento Epidérmico (*EGF* – rs4444903 e rs2237051), Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (*EGFR* – rs2227983), Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (*TGFB1* – rs1800470 e rs4803455) e Receptor do Fator de Crescimento Transformador Beta 2 (*TGFB2* – rs3087465) foram genotipados por PCR em tempo real com ensaio TaqMan. O teste t de Student foi utilizado para comparar a ID entre os grupos com e sem FL±PNS, e a análise de variância (ANOVA) de dois fatores avaliou as variações da ID entre os genótipos ($\alpha = 0,05$), com análise *post-hoc* utilizando correção de Bonferroni.

Resultados: Um total de 209 crianças (100 com FL±PNS e 109 sem FL±PNS), com média de idade cronológica de 8,66 anos (desvio padrão – DP = 1,92), foi incluído. O grupo com FL±PNS apresentou ID significativamente atrasada (média = -0,23; DP = 0,71) em comparação ao grupo sem FL±PNS (média = -0,01; DP = 0,88) ($p = 0,049$). As distribuições genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O SNP rs4803455 em *TGFB1* foi significativamente associado à variação da ID nas crianças sem FL±PNS ($p < 0,01$). No grupo com FL±PNS, não foram observadas diferenças significativas na ID entre os genótipos.

Conclusão: Crianças com FL±PNS apresentaram atraso na ID em comparação com crianças sem FL±PNS. O SNP rs4803455 no gene *TGFB1* está associado a variações na ID em crianças sem FL±PNS.

Palavras-chave: fenda labial; fissura palatina; anormalidades dentárias; determinação da idade pelos dentes; polimorfismo genético.

Introdução

As fissuras orais não-sindrômicas estão entre as anomalias congênitas mais comuns em todo o mundo, resultantes de falhas no desenvolvimento do palato primário e secundário [1], são classificadas como fissura labial (FL), fissura labiopalatina (FLP) e fissura palatina (FP). Considerando que o lábio e o palato primário têm origens embrionárias distintas do palato secundário, a FL e a FLP geralmente são agrupadas sob o termo “fissura labial com ou sem palato” não sindrômicas (FL±PNS) [2].

Tanto fatores genéticos quanto ambientais influenciam a formação do palato primário, secundário e dos dentes. Qualquer alteração nesse processo pode resultar em anomalias craniofaciais e/ou dentárias [3]. Diversas alterações dentárias estão associadas às fissuras orais, especialmente à FL±PNS [4]. Uma revisão sistemática prévia relatou que pacientes com essas malformações tendem a apresentar atraso na idade dentária (ID) em comparação aos não afetados [5]. A ID é um marcador biológico útil para a avaliação do estágio de crescimento infantil, com aplicações na prática clínica odontológica e na área forense [6]. Durante a infância, pacientes com FL±PNS necessitam de diversas intervenções na região craniofacial, incluindo procedimentos ortodônticos e cirúrgicos [7]. Nesses casos, o estágio de maturação é um importante indicador para determinar o momento mais adequado para os tratamentos e obter melhores desfechos [5]. Assim, a ID pode ser uma ferramenta inicial para estimar o estágio de crescimento infantil [8].

Genes que codificam fatores de crescimento apresentam atividade pleiotrópica, desempenhando papéis na formação dentária e craniofacial. O Fator de Crescimento Epidérmico (*EGF*) e seu receptor (*EGFR*) são essenciais para a fusão palatina adequada [9], desenvolvimento e a erupção dentária [10-12]. O Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (*TGFB1*) atua durante a proliferação celular e o crescimento dos processos palatinos [13], bem como na diferenciação de odontoblastos e ameloblastos [14, 15]. O *TGFB1* age por meio de ligação ao receptor *TGFB2*, expresso no palato durante sua fusão [16], na polpa dentária embrionária e nos pré-odontoblastos radiculares [17, 18]. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nesses genes vêm sendo associados a alterações na região craniofacial, como FL±PNS (rs4444903 no *EGF*) [19], retrognatismo mandibular (rs3087465 no *TGFB2*), e variações no tamanho dental (rs4444903 no *EGF* e rs1800470 no *TGFB1*) [20].

Apesar de existirem estudos que investigam a associação entre ID e SNPs na população geral [6, 21, 22], ainda há uma lacuna no entendimento de como essas variações genéticas influenciam a ID em crianças com FL±PNS. Essa lacuna limita o conhecimento sobre como

esses fatores genéticos contribuem para o desenvolvimento dentário desses pacientes, que frequentemente enfrentam alterações nesse processo. Portanto, este estudo tem como objetivo comparar a ID entre crianças com e sem FL±PNS e avaliar a associação entre SNPs em genes codificadores de fatores de crescimento e variações na ID.

Materiais e métodos

Aspectos éticos

Este estudo transversal com grupo de comparação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da área de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (número do protocolo 3.752.172) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (número do protocolo 5.100.185), ambos localizados em Curitiba, Paraná, Brasil. O termo de assentimento e o termo de consentimento livre e esclarecido foram obtidos, das crianças e de seus responsáveis legais, respectivamente. Este estudo está sendo reportado de acordo com o *checklist Strengthening the Reporting of Genetic Association Study Statement* (STREGA) [23]. A coleta de dados ocorreu entre janeiro de 2022 e agosto de 2023.

Critérios de elegibilidade e cálculo do tamanho amostral

Crianças com FL±PNS, com idades entre 5 e 14 anos, foram recrutadas em um centro de referência para o tratamento de deformidades craniofaciais localizado no Brasil (Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Labiopalatal – CAIF –, Curitiba, Paraná, Brasil). Esse centro foi o primeiro do sul do Brasil destinado ao tratamento de anomalias craniofaciais, oferecendo atendimento médico e odontológico, aconselhamento genético, bem como suporte psicológico e social [24].

O tipo de fissura foi classificado com base no exame clínico e confirmado por meio dos prontuários médicos. Casos de FP não foram incluídos, devido à origem embriológica distinta desse tipo de defeito [2]. Um grupo de comparação composto por crianças sem FL±PNS, também com idades entre 5 e 14 anos, foi selecionado nas clínicas odontológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba, Paraná, Brasil), tendo a ausência de fissura sido confirmada por exame clínico. Foram excluídas crianças com síndromes, anomalias craniofaciais diferentes das fissuras orais ou que não possuíam radiografia panorâmica.

O cálculo amostral foi realizado com base em dados da associação entre fissuras orofaciais e anomalias dentárias [4]. A estimativa considerou um poder estatístico de 80%, um intervalo de confiança de 95% (IC 95%), uma razão de chances (*odds ratio* – OR) de 3,14 e uma taxa de anomalias dentárias de 38,8% entre indivíduos sem fissura oral. Considerando uma perda amostral estimada de 20%, o tamanho final da amostra deveria ser de no mínimo 100 e no máximo 120 crianças por grupo. Os participantes foram selecionados por conveniência, sendo convidados a participar aqueles que estavam presentes nos locais de recrutamento.

Avaliação da ID

Radiografias panorâmicas obtidas dos prontuários odontológicos das crianças foram avaliadas por duas examinadoras para a determinação da ID [2]. As examinadoras classificaram os dentes permanentes da hemiarcada mandibular esquerda (excluindo o terceiro molar) em uma escala de A a H, de acordo com o estágio de mineralização dentária, conforme proposto por Demirjian et al. (1973) [25]. Quando um dente permanente do lado esquerdo da mandíbula estava ausente, o dente permanente contralateral do lado direito foi avaliado. Crianças com ausência bilateral de um ou mais dentes foram excluídas.

Antes da avaliação das radiografias panorâmicas, as examinadoras – duas odontopediatras (G.F.S. e L.A.S.) – passaram por um processo de treinamento e calibração. Esse processo teve início com uma discussão teórica sobre o método de Demirjian [25], conduzida por uma examinadora de referência com experiência na metodologia. A calibração consistiu na análise de 20 radiografias panorâmicas apresentando diferentes estágios de mineralização dentária. As avaliadoras analisaram cada imagem de forma independente e repetiram as avaliações após um intervalo de uma semana para cálculo da reprodutibilidade intraexaminadora. Para a reprodutibilidade interexaminadora, os escores obtidos foram comparados aos da examinadora de referência. Os coeficientes kappa intra e interexaminadores foram, respectivamente, 0,90 e 0,82.

A ID foi calculada por meio do aplicativo *Dental Age* [26], que, de acordo com o sexo da criança, converte a pontuação atribuída aos sete dentes avaliados em um valor de ID, baseado nas tabelas propostas por Demirjian et al. [25]. A variação na ID foi determinada por um delta, obtido pela diferença entre a ID e a idade cronológica (IC) ($ID - IC$). Valores positivos,

negativos ou nulos indicam que a criança apresenta uma idade dentária avançada, atrasada ou compatível com a idade cronológica, respectivamente [22].

A literatura reporta que o método de Demirjian et al. tende a superestimar a ID em relação à IC [27]. Assim, avaliou-se a correlação entre ID e IC na amostra deste estudo, por meio do teste de correlação de Spearman. Observou-se uma correlação positiva e forte entre IC e ID em ambos os grupos – com e sem FL±PNS ($p<0,01$) (Tabela 1), confirmando a aplicabilidade do método de Demirjian et al. na população estudada.

Tabela 1. Correlação entre a IC e ID de acordo com o grupo (n=209).

ID		Grupos	
		Com FL±PNS	Sem FL±PNS
IC	r^*	0,886	0,905
	Valor de p	<0,01	<0,01

*Coeficiente de Spearman. Negrito indica resultados estatisticamente significantes.

Abreviaturas: FL±PNS – fissura labial com ou sem acometimento de palato não-sindrômica; IC – Idade cronológica; ID – Idade dentária.

Extração de DNA e análise de genotipagem

O DNA foi extraído a partir de células bucais coletadas por meio de bochecho com 5 mL de solução salina [28]. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). A genotipagem foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Todas as análises laboratoriais foram conduzidas de forma cega em relação à condição clínica dos participantes.

Os SNPs nos genes *EGF* (rs2237051 e rs4444903), *EGFR* (rs2227983), *TGFBI* (rs1800470 e rs4803455) e *TGFBR2* (rs3087465 e rs764522) foram selecionados com base na frequência do alelo menor (*minor allele frequency* – MAF) e na função biológica desses marcadores. As características dos genes e dos SNPs selecionados estão apresentadas na Tabela 2. A taxa de sucesso da genotipagem encontra-se descrita na Tabela S1 (material suplementar).

Análise estatística

A variável dependente “ID” foi analisada como uma variável contínua. As variáveis independentes foram avaliadas como categóricas: o fenótipo foi dicotomizado nos grupos “com

FL±PNS” e “sem FL±PNS”, e o genótipo foi categorizado de acordo com o par de alelos de cada SNP. O teste t de Student foi utilizado para comparar as variações na ID entre os grupos fenotípicos. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Para os dados de genotipagem, o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi testado por meio do teste do qui-quadrado (<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>). O teste ANOVA de dois fatores foi aplicado para analisar o efeito das variáveis independentes “fenótipo” e “genótipo”, bem como a interação entre essas variáveis na variação da ID ($\alpha = 5\%$). Para reduzir a ocorrência de falsos positivos, foi adotada a correção de Bonferroni, com nível de significância ajustado para 0,016. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software Statistical Package for the Social Sciences*, versão 20.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA).

Tabela 2. Características dos genes e polimorfismos selecionados.

Gene	Papel do gene		Características do SNP		
	Palatogênese	Odontogênese	ID	Alteração de base	Função
<i>EGF</i>	• Essencial para o crescimento e diferenciação de células epiteliais [9, 14, 15].	• Inibe a morfogênese e a diferenciação celular dos tecidos dentários durante a embriogênese [10].	rs4444903	A>G	Transcrito não codificante
	• Participa da degeneração das células epiteliais durante a formação do palato secundário [9, 14, 15].	• Atua na erupção dentária [11, 12].	rs2237051	A>G	Mutação do tipo <i>missense</i>
<i>EGFR</i>	• Essencial para o crescimento e diferenciação de células epiteliais [9, 14, 15].	• Influencia a taxa de proliferação celular durante a odontogênese, impactando a duração do processo [33].	rs2227983	A>G	Mutação do tipo <i>missense</i>
	• Participa da degeneração das células epiteliais durante a formação do palato secundário [9, 14, 15].				0,264
<i>TGFBI</i>	• Atua na proliferação celular e crescimento dos processos palatinos [13].	• Participa da regulação da diferenciação de odontoblastos [14].	rs4803455	C>A	Íntron
	• Regula a proliferação de células mesenquimais e a síntese de matriz extracelular no palato [13].	• Participa da diferenciação do órgão do esmalte e início da secreção de matriz [15].	rs1800470	A>G	Mutação do tipo <i>missense</i>
<i>TGFBR2</i>	• Atua na fusão normal do palato [16].	• Desempenha funções diversas no desenvolvimento dentário e na reparação do tecido pulpar [17].	rs764522	C>G	Região a montante (<i>upstream</i>)
		• Atua na formação de osteodentina [18].	rs3087465	A>G	Região a montante (<i>upstream</i>)

Informações obtidas nas bases: <http://www.thermofisher.com> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Abreviaturas: SNP – polimorfismos de nucleotídeo único; MAF – Frequência do alelo menor; *EGF* – Fator de Crescimento Epidérmico; *EGFR* – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico; *TGFBI* – Fator de Crescimento Transformador Beta 1; *TGFBR2* – Receptor do Fator de Crescimento Transformador Beta 2.

Resultados

Ao todo, 292 crianças foram recrutadas e avaliadas. Destas, 83 foram excluídas pelos seguintes motivos: presença de síndromes (n=13), presença de outras anomalias craniofaciais além da fissura oral (n=5), presença de FP (n=20), ausência de radiografia panorâmica (n=41) e ausência bilateral de dentes na mandíbula (n=4). A amostra final foi composta por 100 crianças (61 meninos e 39 meninas) com FL±PNS e 109 crianças (52 meninos e 57 meninas) sem FL±PNS. A Figura 1 ilustra o fluxograma do estudo.

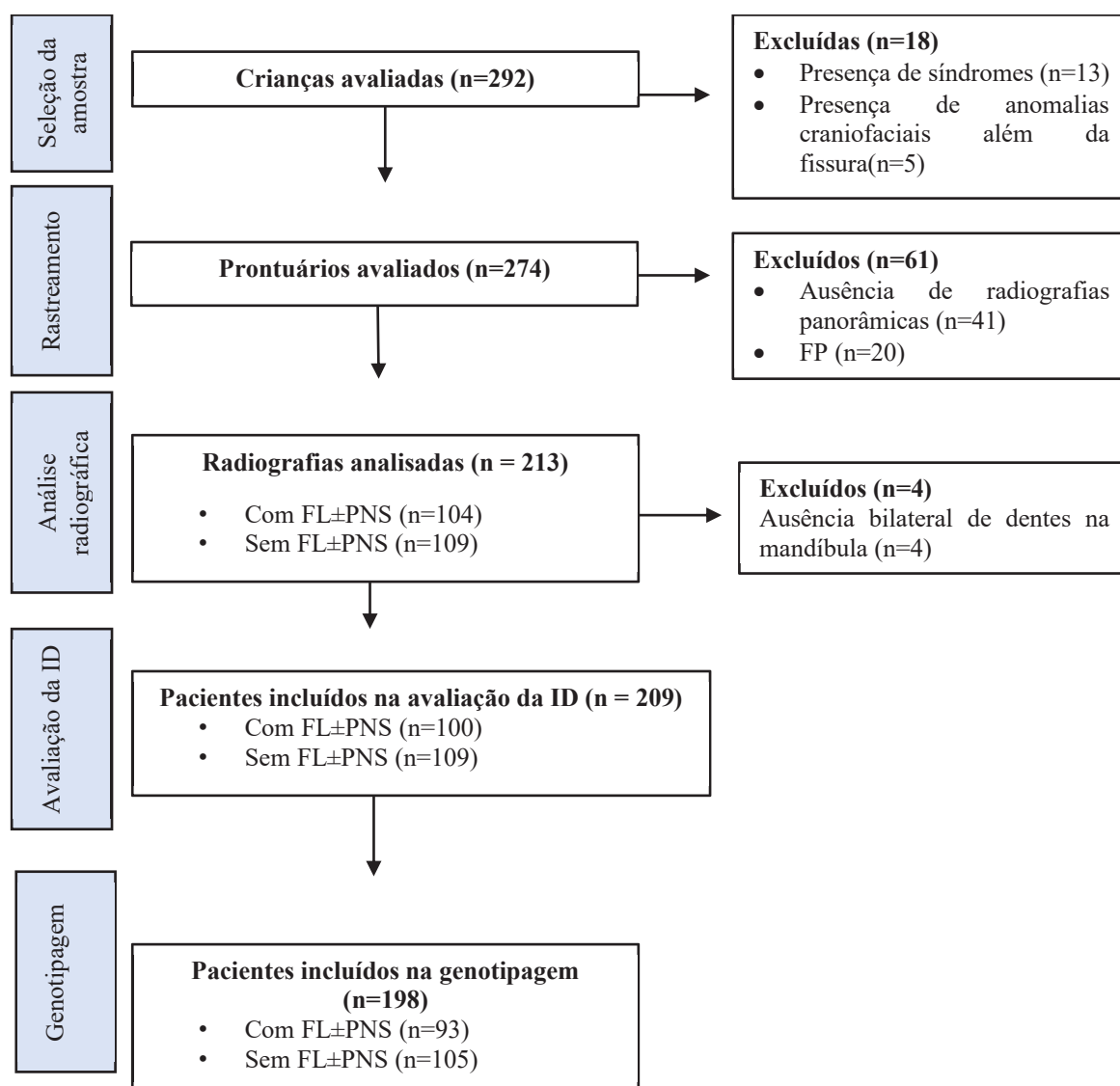


Fig. 1 Seleção dos participantes do estudo.

No grupo com FL±PNS, 35 crianças (35%) apresentavam apenas FL e 65 (65%) apresentavam FLP. A média de IC da amostra total foi de 8,66 anos – desvio padrão (DP) = 1,92. O grupo com FL±PNS demonstrou ID significativamente atrasada (média = -0,23; DP =

0,71) em comparação com o grupo sem FL±PNS (média = -0,01; DP = 0,88) ($p = 0,049$) (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação da IC, ID e delta de acordo com o grupo (n=209).

Group	IC Média (DP)	ID Média (DP)	Delta (DA-CA) Média (DP)
Sem FL±PNS	8,52 (1,69)	8,29 (1,80)	-0,23 (0,71)
Com FL±PNS	8,82 (2,12)	8,81 (1,96)	-0,01 (0,88)
Valor de p^*	0,207	0,036	0,049

*Teste t de Student. Negrito indica resultados estatisticamente significantes.

Abreviaturas: FL±P – Fissura labial com ou sem acometimento de palato não-sindrômica; IC – Idade cronológica; ID – Idade dentária; DP – Desvio padrão.

A análise genotípica foi viável em amostras de DNA de 198 crianças (93 com FL±PNS e 105 sem FL±PNS). A distribuição dos genótipos está apresentada na Tabela S1 (material suplementar). A Tabela 4 apresenta os resultados da ANOVA de dois fatores, realizada para analisar o efeito das variáveis independentes "fenótipo" e "genótipo", bem como a interação entre essas variáveis na variação da ID. O teste de efeito principal simples indicou que nenhum dos SNPs avaliados apresentou efeito significativo sobre a variação da ID ($p > 0,05$). No entanto, ao considerar a interação "fenótipo-genótipo", foi identificada uma interação estatisticamente significativa entre os efeitos do SNP rs4803455 e o fenótipo na variação da ID ($p < 0,01$). A análise *post-hoc* com correção de Bonferroni indicou que, no fenótipo “sem FL±PNS”, a ID foi significativamente mais avançada em crianças com o genótipo AA no rs4803455 (delta médio = 0,66; DP = 1,02) em comparação com aquelas com os genótipos CA (delta médio = -0,10; DP = 0,77) ou CC (delta médio = -0,20; DP = 0,88) ($p < 0,01$). Contudo, no fenótipo “com FL±PNS”, não foram observadas diferenças significativas na ID entre os diferentes genótipos.

Tabela 4. Comparação das variações na ID de acordo com o fenótipo e o genótipo por meio do teste ANOVA de dois fatores (n = 198).

SNP (gene)	Genótipo	Média de variação da ID (DP)			Valor de p*		
		Com FL±PNS	Sem FL±PNS	Efeito do fenótipo	Efeito do genótipo	Interação fenótipo-genótipo	
rs4444903 (EGF)	AA	-0,39 (DP=0,16)	-0,13 (DP=0,70)				
	AG	-0,17 (DP=0,17)	-0,03 (DP=1,00)	0,045	0,521		0,723
	GG	-0,32 (DP=0,19)	-0,05 (DP=0,75)				
rs2237051 (EGF)	AA	-0,28 (DP=0,69)	-0,15 (DP=0,80)				
	AG	-0,16 (DP=0,69)	-0,005 (DP=0,96)	0,084	0,388		0,905
	GG	-0,40 (DP=0,70)	-0,13 (DP=0,74)				
rs2227983 (EGFR)	AA	-0,85 (DP=0,89)	-0,07 (DP=1,05)				
	AG	-0,23 (DP=0,72)	0,08 (DP=0,86)	0,274	0,605		0,783
	GG	-0,30 (DP=0,69)	-0,10 (DP=0,88)				
rs4803455 (TGFB1)	CC	-0,05 (DP=0,64)	-0,20 (DP=0,88)	0,002	0,223		0,002
	CA	-0,35 (DP=0,78)	-0,10 (DP=0,77)				
	AA	-0,51 (DP=0,44)	0,66 (DP=1,02)				
rs1800470 (TGFB1)	AA	-0,45 (DP=0,54)	0,19 (DP=1,14)				
	AG	-0,30 (DP=0,82)	-0,08 (DP=0,81)	0,058	0,646		0,068
	GG	-0,007 (DP=0,48)	-0,14 (DP=0,81)				
rs764522 (TGFB2)	CC	-0,18 (DP=0,68)	0,007 (DP=0,85)				
	CG	-0,29 (DP=0,76)	-0,14 (DP=1,03)	0,111	0,324		0,774
	GG	-0,67 (DP=0,44)	-0,14 (DP=0,53)				
rs3087465 (TGFB2)	AA	-0,50 (DP=0,83)	0,13 (DP=0,91)				
	AG	-0,32 (DP=0,75)	-0,14 (DP=0,85)	0,029	0,348		0,947
	GG	-0,13 (DP=0,63)	0,027 (DP=0,93)				

*A ANOVA de dois fatores avaliou o efeito das variáveis independentes “fenótipo” e “genótipo”, assim como a interação entre essas variáveis, sobre a variação da ID.

Negrito indica resultados estatisticamente significantes.

Abreviaturas: FL±PNS – Fissura labial com ou sem envolvimento de palato não-sindrômica; ID – Idade dentária; DP – Desvio padrão; *EGF* – Fator de Crescimento Epidérmico; *EGFR* – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico; *TGFB1* – Fator de Crescimento Transformador Beta 1; *TGFB2* – Receptor do Fator de Crescimento Transformador Beta 2.

Discussão

Indivíduos com fissuras orais apresentam maior prevalência de anomalias dentárias do que aqueles sem essas malformações [4]. No presente estudo, crianças com FL±PNS apresentaram ID atrasada em relação às crianças sem FL±PNS. Uma revisão sistemática prévia, que incluiu 36 estudos, relatou que 32 deles encontraram atraso no desenvolvimento e na erupção dentária em pacientes com fissuras [5]. Contudo, de acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar a ID em indivíduos com FL±PNS considerando também sua base genética.

O método proposto por Demirjian et al. (1973) é o mais utilizado para avaliação da ID [29] e foi adotado neste estudo. Nesse método, avaliam-se os sete dentes mandibulares esquerdos [3]. A escolha pela arcada inferior é preferível, uma vez que, na maxila, a superposição de estruturas ósseas pode interferir na análise [5]. Em pacientes com FL±PNS, a presença da fissura e as frequentes alterações morfológicas dos dentes na arcada superior também podem dificultar a avaliação [4]. A presença de anomalias dentárias fora da região da fissura, inclusive na mandíbula, sugere que fatores genéticos comuns participam do desenvolvimento dentário e do palato [30,31]. Assim, as variações de ID observadas apenas com base nos dentes inferiores reforçam a hipótese de uma base genética compartilhada entre as alterações dentárias e as fissuras orofaciais.

Fatores de crescimento e seus receptores, moléculas envolvidas em diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, migração e apoptose [32], têm sido relacionados à odontogênese e à palatogênese [9-11,13-17,33]. O presente estudo avaliou o efeito de SNPs em genes codificadores de fatores de crescimento e da presença de FL±PNS sobre a variação da ID. Entre os SNPs avaliados, apenas o rs4803455 no gene *TGFBI* foi associado a variações na ID, e isso ocorreu apenas em crianças sem FL±PNS. Nesse grupo, crianças com o genótipo AA apresentaram ID mais avançada em comparação com aquelas com os genótipos CA ou CC. Este SNP, localizado em um íntron, não possui função codificadora, mas pode atuar na regulação da expressão gênica, no *splicing* alternativo, transporte de RNA mensageiro e organização da cromatina [34]. Na literatura, esse SNP foi associado a diversas condições de saúde, como artrite reumatoide [35,36], doença arterial coronariana [37] e câncer de pulmão [38]. No entanto, há pouca evidência relacionada a fenótipos dentários e craniofaciais; apenas um estudo associou o SNP rs1800470 a variações no tamanho dentário [20]. Assim, é possível sugerir que o rs4803455 esteja relacionado ao desenvolvimento dentário em indivíduos sem FL±PNS, sendo necessário investigar essa associação em outras populações.

No grupo com FL±PNS, nenhum dos SNPs avaliados mostrou associação significativa com a ID. As diferenças entre os grupos podem ser atribuídas à influência combinada de fatores genéticos e ambientais sobre a expressão dos genótipos [39]. A etiologia de FL±PNS é complexa, envolvendo fatores genéticos e ambientais [40]. Portanto, é plausível considerar que indivíduos com e sem FL±PNS estejam expostos a diferentes fatores durante o desenvolvimento, o que pode impactar no desenvolvimento dentário. Ademais, é possível que outros polimorfismos genéticos estejam envolvidos no atraso da ID observado nesse grupo. A ausência de associação significativa entre os SNPs avaliados pode refletir essa complexidade, além de possíveis limitações do tamanho amostral.

Há evidências em estudos com embriões humanos e murinos de que os genes *EGF*, *EGFR* e *TGFB2* desempenham papéis importantes na diferenciação celular e formação dos tecidos dentários [10,11,15,17,18,33]. No entanto, estudos em humanos investigando a associação entre SNPs nesses genes e o desenvolvimento dentário ainda são escassos. Apenas a associação entre o rs4444903 no gene *EGF* e variações no tamanho dentário foi descrita [20]. No presente estudo, não foi observada associação entre esses SNPs e a ID.

Estudos prévios com indivíduos sem FL±PNS investigaram a associação entre ID e SNPs nos genes do receptor de vitamina D (*VDR*) [6], dos receptores de estrogênio alfa e beta (*ESR1* e *ESR2*) [22], e da família dos fatores de crescimento fibroblástico (*FGF*) [21]. Os SNPs em *VDR*, *ESR1* e *ESR2* não apresentaram associação com a ID [6,22]. Por outro lado, o SNP rs4073716 no *FGF18* foi associado a ID avançada [21].

Além dos fatores genéticos, exposições ambientais como desequilíbrios hormonais [41], obesidade [42], doença celíaca [43] e tratamentos oncológicos [44] também têm sido associadas a variações na ID. No presente estudo, essas exposições não foram consideradas, o que representa uma limitação. O método de Demirjian é frequentemente criticado por superestimar a ID [27]; contudo, foi observada forte correlação entre ID e idade cronológica em ambos os grupos. Embora os grupos não tenham sido pareados por idade, foram incluídas crianças de faixas etárias semelhantes e da mesma região geográfica, o que minimiza possíveis vieses comparativos [5]. Outra limitação está relacionada à generalização dos achados, que podem não se aplicar a populações com diferentes origens genéticas ou exposições ambientais. Estudos futuros devem considerar o pareamento por idade, explorar a interação entre fatores ambientais e genéticos e realizar avaliações longitudinais para entender melhor a progressão da ID em pacientes com FL±PNS.

Apesar das limitações, foi possível observar que crianças com FL±PNS apresentaram ID atrasada em relação às crianças sem a malformação. Clinicamente, essa característica pode impactar o tempo adequado de intervenções como cirurgias de lábio e palato, enxertos ósseos e tratamentos ortodônticos [7]. Além disso, a ID pode ser uma ferramenta útil na área forense, auxiliando na estimativa da idade em casos de registros de nascimento incertos [5]. O SNP rs4803455 em *TGFB1* foi associado à ID apenas no grupo sem FL±PNS, sugerindo que diferentes fatores genéticos podem influenciar o desenvolvimento dentário nos distintos grupos avaliados. Compreender a base genética de características dentárias fornece subsídios importantes para identificar fatores de risco associados a anomalias dentárias. Esses achados destacam o potencial da integração entre dados genéticos e de ID na prática clínica, visando um cuidado mais personalizado e efetivo para pacientes com FL±PNS.

Conclusão

Crianças com FL±PNS apresentaram ID mais atrasada em comparação àquelas sem a malformação. O SNP rs4803455 no gene *TGFB1* mostrou-se associado a variações na ID em crianças sem FL±PNS. Esses achados contribuem para o aprofundamento da compreensão sobre os mecanismos genéticos e do desenvolvimento craniofacial e dentário. Estudos futuros devem investigar essas variáveis em diferentes populações, com o objetivo de aprimorar o cuidado personalizado de pacientes com FL±PNS.

References

1. Salari N, Darvishi N, Heydari M, Bokae S, Darvishi F, Mohammadi M. Global prevalence of cleft palate, cleft lip and cleft palate and lip: A comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2022;123(2):110-20.
2. Martinelli M, Palmieri A, Carinci F, Scapoli L. Non-syndromic Cleft Palate: An Overview on Human Genetic and Environmental Risk Factors. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:592271.
3. Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M, John N, Sommer L, Graf D, et al. The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2011;121(7-8):636-46.
4. Fonseca-Souza G, de Oliveira LB, Wambier LM, Scariot R, Feltrin-Souza J. Tooth abnormalities associated with non-syndromic cleft lip and palate: systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2022;26(8):5089-103.

5. Van Dyck J, Cadenas de Llano-Pérula M, Willems G, Verdonck A. Dental development in cleft lip and palate patients: A systematic review. *Forensic Sci Int.* 2019;300:63-74.
6. Kùchler EC, Carelli J, Morais ND, Brancher JA, de França Lopes CMC, Baratto-Filho F, et al. Assessing the association between vitamin D receptor and dental age variability. *Clin Oral Investig.* 2022;26(2):1677-82.
7. Mundra LS, Lowe KM, Khechoyan DY. Alveolar Bone Graft Timing in Patients With Cleft Lip & Palate. *J Craniofac Surg.* 2022;33(1):206-10.
8. Barreto BCT, Marañón-Vásquez GA, da Costa Barreto LS, Masterson D, de Souza MMG, Maia LC. Is there a correlation between dental and cervical vertebrae maturation stages in growing subjects? A systematic review with meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2022;26(5):3823-42.
9. Fujino M, Osumi N, Ninomiya Y, Iseki S, Shibasaki Y, Eto K. Disappearance of epidermal growth factor receptor is essential in the fusion of the nasal epithelium. *Anat Sci Int.* 2003;78(1):25-35.
10. Mitsiadis T, Magloire H. [Epidermal growth factor in tooth development]. *Actual Odontostomatol (Paris).* 1990;44(170):257-70.
11. Shroff B, Kashner JE, Keyser JD, Hebert C, Norris K. Epidermal growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. *Arch Oral Biol.* 1996;41(6):613-7.
12. Wise GE, Lin F, Fan W. Localization of epidermal growth factor and its receptor in mandibular molars of the rat prior to and during prefunctional tooth eruption. *Dev Dyn.* 1992;195(2):121-6.
13. Nawshad A, LaGamba D, Hay ED. Transforming growth factor beta (TGFbeta) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Arch Oral Biol.* 2004;49(9):675-89.
14. Li S, Pan Y. Differential expression of transforming growth factor-beta1, connective tissue growth factor, phosphorylated-SMAD2/3 and phosphorylated-ERK1/2 during mouse tooth development. *J Mol Histol.* 2017;48(5-6):347-55.
15. Sassá Benedete AP, Sobral AP, Lima DM, Kamibeppu L, Soares FA, Lourenço SV. Expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 in human developing teeth: immunolocalization according to the odontogenesis phases. *Pediatr Dev Pathol.* 2008;11(3):206-12.

16. Suzuki Y, Nakajima A, Kawato T, Iwata K, Motoyoshi M, Shuler CF. Identification of Smad-dependent and -independent signaling with transforming growth factor- β type 1/2 receptor inhibition in palatogenesis. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020;10(2):43-8.
17. Toyono T, Nakashima M, Kuhara S, Akamine A. Expression of TGF-beta superfamily receptors in dental pulp. *J Dent Res.* 1997;76(9):1555-60.
18. Zhang R, Lin J, Liu Y, Yang S, He Q, Zhu L, et al. Transforming Growth Factor- β Signaling Regulates Tooth Root Dentinogenesis by Cooperation With Wnt Signaling. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:687099.
19. Yan J, Song H, Mi N, Jiao X, Hao Y. Nucleotide variants of the NAT2 and EGF61 genes in patients in Northern China with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(37):e7973.
20. Gerber JT, Dos Santos KM, Brum BK, Petinati MFP, Meger MN, da Costa DJ, et al. Odontogenesis-related candidate genes involved in variations of permanent teeth size. *Clin Oral Investig.* 2021;25(7):4481-94.
21. Modesto A, Jacas CA, Kim SM, Desman A, West I, Lebow M, et al. Childhood Obesity, Genetic Variation, and Dental Age. *Pediatr Dent.* 2019;41(2):132-5.
22. Madalena IR, Reis CLB, Matsumoto MAN, Stuani MBS, Mattos NHR, Oliveira DSB, et al. Investigating the association between dental age and polymorphisms in genes encoding estrogen receptors. *J Appl Oral Sci.* 2023;31:e20230184.
23. Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, et al. STrengthening the REporting of Genetic Association Studies (STREGA)--an extension of the STROBE statement. *Genet Epidemiol.* 2009;33(7):581-98.
24. Baltazar MdM, Lima DP, Matos FGdO, Calixto RD, Moraes RSd, Fidalsk SZK. Atenção à Saúde a Pacientes Fissurados Labiopalatais no Estado do Paraná. In: Ditterich RG, Graziani GF, Moysés SJ, editors. *Caminhos e Trajetórias da Saúde Bucal no Estado do Paraná.* Londrina: iNESCO; 2019. p. 213-40.
25. Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM. A new system of dental age assessment. *Hum Biol.* 1973;45(2):211-27.
26. Baratto Filho F, Abuabara A, Kuchler EC, Paniagua TV, Kirchhoff AL, Oliveira DSB, et al. *Dental Age App.* 0.5 ed. Brazil: Crescendo Treinamentos Avançados Ltda; 2023.
27. Franco A, de Oliveira MN, Campos Vidigal MT, Blumenberg C, Pinheiro AA, Paranhos LR. Assessment of dental age estimation methods applied to Brazilian children: a systematic review and meta-analysis. *Dentomaxillofac Radiol.* 2021;50(2):20200128.

28. Küchler EC, Tannure PN, Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Granjeiro JM, Amorim LM. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(4):467-71.
29. Vila-Blanco N, Varas-Quintana P, Tomás I, Carreira MJ. A systematic overview of dental methods for age assessment in living individuals: from traditional to artificial intelligence-based approaches. *Int J Legal Med.* 2023;137(4):1117-46.
30. Küchler EC, Reis CLB, Silva-Sousa AC, Marañón-Vásquez GA, Matsumoto MAN, Sebastiani A, et al. Exploring the Association Between Genetic Polymorphisms in Genes Involved in Craniofacial Development and Isolated Tooth Agenesis. *Front Physiol.* 2021;12:723105.
31. Phan M, Conte F, Khandelwal KD, Ockeloen CW, Bartzela T, Kleefstra T, et al. Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arms? *Hum Genet.* 2016;135(12):1299-327.
32. Antonioli F, Bublil EM, Yarden Y. Growth Factors. In: Offermanns S, Rosenthal W, editors. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 565-71.
33. Shore RC, Kolokuris I, Robinson C, Kirkham J. Immunohistochemical investigation of epidermal growth factor receptor expression during periods of accelerated rat incisor eruption. *Arch Oral Biol.* 1992;37(5):389-93.
34. Jo BS, Choi SS. Introns: The Functional Benefits of Introns in Genomes. *Genomics Inform.* 2015;13(4):112-8.
35. Iriyoda TMV, Flauzino T, Costa NT, Lozovoy MAB, Reiche EMV, Simão ANC. TGFB1 (rs1800470 and rs1800469) variants are independently associated with disease activity and autoantibodies in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Med.* 2022;22(1):37-45.
36. Patel SL, Prakash J, Gupta V. TGF- β 1 +869C/T polymorphism increases susceptibility to rheumatoid arthritis in North Indian population. *Clin Rheumatol.* 2020;39(10):2881-8.
37. Morris DR, Moxon JV, Biros E, Krishna SM, Golledge J. Meta-analysis of the association between transforming growth factor-beta polymorphisms and complications of coronary heart disease. *PLoS One.* 2012;7(5):e37878.
38. Fan H, Yu H, Deng H, Chen X. Transforming growth factor- β 1 rs1800470 polymorphism is associated with lung cancer risk: a meta-analysis. *Med Sci Monit.* 2014;20:2358-62.
39. Kingdom R, Wright CF. Incomplete Penetrance and Variable Expressivity: From Clinical Studies to Population Cohorts. *Front Genet.* 2022;13:920390.

40. Vyas T, Gupta P, Kumar S, Gupta R, Gupta T, Singh HP. Cleft of lip and palate: A review. *J Family Med Prim Care*. 2020;9(6):2621-5.
41. Torlińska-Walkowiak N, Majewska KA, Kędzia A, Opydo-Szymaczek J. Clinical Implications of Growth Hormone Deficiency for Oral Health in Children: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2021;10(16).
42. Park TH, Lin JH, Chung CH, Zheng Z, Li C. The skeletal and dental age advancements of children and adolescents with overweight and obesity: A systematic review and meta-analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2023;164(3):325-39.
43. Alamoudi NM, Alsadat FA, El-Housseiny AA, Felemban OM, Al Tuwirqi AA, Mosli RH, et al. Dental maturity in children with celiac disease: a case-control study. *BMC Oral Health*. 2020;20(1):311.
44. Vasconcelos NP, Caran EM, Lee ML, Lopes NN, Weiler RM. Dental maturity assessment in children with acute lymphoblastic leukemia after cancer therapy. *Forensic Sci Int*. 2009;184(1-3):10-4.

Tabela S1 – Distribuição da frequência observada dos genótipos e equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos genéticos avaliados (n=198).

Gene	SNP	Grupo	Genótipo (n%)			Total	Taxa de sucesso da genotipagem	Chi-quadrado EHW
			AA	AG	GG			
<i>EGF</i>	rs4444903	Com FL±PNS	26 (28,3)	48 (52,2)	18 (19,6)	92	98,9%	0,1022
		Sem FL±PNS	23 (21,9)	55 (52,4)	27 (25,7)	105	100%	0,2536
	rs2237051	Com FL±PNS	AA	AG	GG			
			19 (20,4)	43 (46,2)	31 (33,3)	93	100%	0,3305
<i>EGFR</i>	rs2227983	Com FL±PNS	AA	AG	GG			
			24 (22,9)	57 (54,3)	24 (22,9)	105	100%	0,6053
	rs2227983	Com FL±PNS	AA	AG	GG			
			8 (8,7)	29 (31,5)	55 (59,8)	92	98,9%	1,9859
<i>TGFBI</i>	rs4803455	Com FL±PNS	CC	CA	AA			
			8 (7,7)	35 (33,7)	61 (58,7)	104	99,0%	0,8574
	rs1800470	Com FL±PNS	CC	CA	AA			
			33 (35,9)	47 (51,1)	12 (13,0)	92	98,9%	0,5583
<i>TGFBR2</i>	rs764522	Com FL±PNS	AA	AG	GG			
			40 (39,2)	49 (48,0)	13 (12,7)	102	97,1%	0,1123
	rs3087465	Com FL±PNS	AA	AG	GG			
			21 (22,8)	49 (53,3)	22 (23,9)	92	98,9%	0,3928
	rs764522	Com FL±PNS	CC	CG	GG			
			19 (18,4)	54 (52,4)	30 (29,1)	103	98,1%	0,3788
	rs3087465	Com FL±PNS	CC	CG	GG			
			52 (55,9)	36 (38,7)	5 (5,4)	93	100%	0,147
	rs3087465	Com FL±PNS	AA	AG	GG			
			64 (62,7)	32 (31,4)	6 (5,9)	102	97,1%	0,5395
	rs3087465	Com FL±PNS	AA	AG	GG			
			7 (7,6)	41 (44,6)	44 (47,8)	92	98,9%	0,3684
	rs3087465	Com FL±PNS	AA	AG	GG			
			15 (15,0)	41 (41,0)	44 (44,0)	100	95,2%	1,0963

Abreviaturas: FL±P – Fissura labial com ou sem envolvimento de palato; *EGF* – Fator de Crescimento Epidérmico; *EGFR* – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico; *TGFBI* – Fator de Crescimento Transformador Beta 1; *TGFBR2* – Receptor do Fator de Crescimento Transformador Beta 2.

6 CONCLUSÃO

Os achados deste trabalho evidenciam que indivíduos com FL/PNS apresentam maior frequência de anomalias dentárias, incluindo DDE, AD e atraso na cronologia de formação dentária. Embora a maioria dos polimorfismos analisados isoladamente não tenha se associado de forma significativa a essas alterações, interações entre variantes localizadas em genes relacionados à homeostase mineral – como *CALCR*, *CYP24A1* e *PTH* – mostraram-se associadas tanto à presença de FL±PNS quanto à ocorrência simultânea de FL±PNS e HMI/HSMD. Por outro lado, os genes que codificam fatores de crescimento, como *EGF* e *TGFB1*, apresentaram associações isoladas com a presença de FL±PNS e com a variação da idade dentária, respectivamente.

O uso de diferentes fenótipos dentários como marcadores auxiliares contribuiu para uma abordagem mais abrangente do papel dos fatores genéticos na etiologia das fissuras labiopalatinas. A identificação de interações genéticas relevantes, mesmo na ausência de associações diretas em análises individuais, ressalta a complexidade das vias moleculares envolvidas e a importância de modelos analíticos que considerem essas interações.

Dessa forma, este conjunto de estudos oferece subsídios relevantes para a compreensão da etiologia multifatorial das FL±PNS, propondo uma perspectiva integrada que associa dados morfológicos, clínicos e genéticos. A adoção dessa abordagem pode colaborar com a estratificação fenotípica de indivíduos com FL±PNS, contribuir para o avanço do conhecimento sobre a biologia do desenvolvimento craniofacial e orientar estratégias mais personalizadas no acompanhamento clínico e na pesquisa genética futura.

REFERÊNCIAS

ALADE, A.; AWOTOYE, W.; BUTALI, A. Genetic and epigenetic studies in non-syndromic oral clefts. **Oral diseases**, v. 28, n. 5, p. 1339-1350, 2022.

ALLORI, A. C.; MULLIKEN, J. B.; MEARA, J. G.; SHUSTERMAN, S. *et al.* Classification of Cleft Lip/Palate: Then and Now. **The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association**, v. 54, n. 2, p. 175-188, 2017.

AMERICANO, G. C.; JACOBSEN, P. E.; SOVIERO, V. M.; HAUBEK, D. A systematic review on the association between molar incisor hypomineralization and dental caries. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 27, n. 1, p. 11-21, 2017.

ANTONIOLI, F.; BUBLIL, E. M.; YARDEN, Y. Growth Factors. *In*: OFFERMANN, S. e ROSENTHAL, W. (Ed.). **Encyclopedia of Molecular Pharmacology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 565-571.

ASSIS MACHADO, R.; DE TOLEDO, I. P.; MARTELLI-JÚNIOR, H.; REIS, S. R. *et al.* Potential genetic markers for nonsyndromic oral clefts in the Brazilian population: A systematic review and meta-analysis. **Birth defects research**, v. 110, n. 10, p. 827-839, 2018.

AZMAN, A.; MANUEL, A. M. Otological outcome in cleft lip and palate children with middle ear effusion. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 138, p. 110274, 2020.

BABAI, A.; IRVING, M. Orofacial Clefts: Genetics of Cleft Lip and Palate. **Genes**, v. 14, n. 8, 2023.

BARRETO, B. C. T.; MARAÑÓN-VÁSQUEZ, G. A.; DA COSTA BARRETO, L. S.; MASTERSON, D. *et al.* Is there a correlation between dental and cervical vertebrae maturation stages in growing subjects? A systematic review with meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**, v. 26, n. 5, p. 3823-3842, 2022.

BARRIO, M. C.; DEL RÍO, A.; MURILLO, J.; MALDONADO, E. *et al.* Epidermal growth factor impairs palatal shelf adhesion and fusion in the Tgf- β 3 null mutant. **Cells, Tissues, Organs**, v. 199, n. 2-3, p. 201-211, 2014.

BARTZELA, T. N.; CARELS, C. E.; BRONKHORST, E. M.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. Tooth agenesis patterns in unilateral cleft lip and palate in humans. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 6, p. 596-602, 2013.

BAWDEN, J. W.; DEATON, T. G.; CRENSHAW, M. A. The effects of parathyroid hormone, calcitonin, and vitamin D metabolites on calcium transport in the secretory rat enamel organ. **Journal of Dental Research**, v. 62, n. 9, p. 952-955, 1983.

BEAMES, T. G.; LIPINSKI, R. J. Gene-environment interactions: aligning birth defects research with complex etiology. **Development** v. 147, n. 21, 2020.

BERDAL, A.; PAPAGERAKIS, P.; HOTTON, D.; BAILLEUL-FORESTIER, I. *et al.* Ameloblasts and odontoblasts, target-cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3: a review. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 39, n. 1, p. 257-262, 1995.

BEZERRA, J. F.; OLIVEIRA, G. H.; SOARES, C. D.; CARDOSO, M. L. *et al.* Genetic and non-genetic factors that increase the risk of non-syndromic cleft lip and/or palate development. **Oral diseases**, v. 21, n. 3, p. 393-399, 2015.

BIKLE, D. D. Vitamin D: production, metabolism and mechanisms of action. *In*: FEINGOLD KR, A. S., Anawalt B, et al. (Ed.). **Endotext** South Dartmouth: MDText.com, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278935/>.

CHIA, Z. J.; CAO, Y. N.; LITTLE, P. J.; KAMATO, D. Transforming growth factor- β receptors: versatile mechanisms of ligand activation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 45, n. 7, p. 1337-1348, 2024.

CHU, E. Y.; TAMASAS, B.; FONG, H.; FOSTER, B. L. *et al.* Full Spectrum of Postnatal Tooth Phenotypes in a Novel Irf6 Cleft Lip Model. **Journal of dental research**, v. 95, n. 11, p. 1265-1273, 2016.

COSTANZO, L. S. Fisiologia Endócrina. *In*: COSTANZO, L. S. (Ed.). **Fisiologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2024. cap. 9, p. 383-446. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595159761/>. Acesso em: jul 2025.

DE LA DURE-MOLLA, M.; FOURNIER, B. P.; MANZANARES, M. C.; ACEVEDO, A. C. *et al.* Elements of morphology: Standard terminology for the teeth and classifying genetic dental disorders. v. 179, n. 10, p. 1913-1981, 2019.

DE OLIVEIRA JÚNIOR, A. G.; MONTAGNA, E.; ZAIA, V.; BARBOSA, C. P. *et al.* Oral health-related quality of life in patients aged 8 to 19 years with cleft lip and palate: a systematic review and meta-analysis. **BMC oral health**, v. 23, n. 1, p. 670, 2023.

DE STEFANI, A.; BRUNO, G.; BALASSO, P.; MAZZOLENI, S. *et al.* Prevalence of Hypodontia in Unilateral and Bilateral Cleft Lip and Palate Patients Inside and Outside Cleft Area: A Case-Control Study. **The Journal of clinical pediatric dentistry**, v. 43, n. 2, p. 126-130, 2019.

DENTISTRY, A. A. o. P. Policy on the Management of Patients with Cleft Lip/Palate and Other Craniofacial Anomalies. *In*: **The Reference Manual of Pediatric Dentistry**: American Academy of Pediatric Dentistry, 2022. p. 576-577.

ELZEIN, R.; ABDEL-SATER, F.; MEHAWAJ, C.; JALKH, N. *et al.* Identification by whole-exome sequencing of new single-nucleotide polymorphisms associated with molar-incisor hypomineralisation among the Lebanese population. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 23, n. 6, p. 919-928, 2022.

FAN, L.; KAN, S.; YANG, F.; XU, H. *et al.* Non-syndromic cleft lip with or without palate susceptible loci is associated with tooth agenesis. **Oral Diseases**, v. 25, n. 3, p. 803-811, 2019.

FARIAS, A.; ROJAS-GUALDRÓN, D. F.; RESTREPO, M.; ZECCHIN, K. G. *et al.* Characterization of enamel developmental defects in patients with orofacial clefts and their relationship to surgical procedures. **Clinical oral investigations**, v. 27, n. 12, p. 7809-7820, 2023.

FATTURI, A. L.; MENONCIN, B. L.; REYES, M. T.; MEGER, M. *et al.* The relationship between molar incisor hypomineralization, dental caries, socioeconomic factors, and polymorphisms in the vitamin D receptor gene: a population-based study. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 11, p. 3971-3980, 2020.

FELL, M.; DACK, K.; CHUMMUN, S.; SANDY, J. *et al.* Maternal Cigarette Smoking and Cleft Lip and Palate: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association**, v. 59, n. 9, p. 1185-1200, 2022.

FELTRIN-SOUZA, J.; FONSECA-SOUZA, G.; PINHEIRO, E.; FRAIZ, F. C. *et al.* Systemic and Environmental Risk Factors Associated with Molar Incisor Hypomineralisation. **Monographs in Oral Science**, v. 32, p. 117-139, 2024.

FONSECA-SOUZA, G.; DE OLIVEIRA, L. B.; WAMBIER, L. M.; SCARIOT, R. *et al.* Tooth abnormalities associated with non-syndromic cleft lip and palate: systematic review and meta-analysis. **Clinical oral investigations**, v. 26, n. 8, p. 5089-5103, 2022.

GERBER, J. T.; DOS SANTOS, K. M.; BRUM, B. K.; PETINATI, M. F. P. *et al.* Odontogenesis-related candidate genes involved in variations of permanent teeth size. **Clinical oral investigations**, v. 25, n. 7, p. 4481-4494, 2021.

GERBER, J. T.; WEISS, S. G.; MIJOLARO, L. V.; SILVA, C. S. *et al.* Polymorphisms in hormonal-related genes might be associated with variations in permanent tooth crown size. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v. 26, n. 4, p. 539-545, 2023.

GERMEC CAKAN, D.; NUR YILMAZ, R. B.; BULUT, F. N.; AKSOY, A. Dental Anomalies in Different Types of Cleft Lip and Palate: Is There Any Relation? **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 29, n. 5, p. 1316-1321, 2018.

GHANIM, A.; ELFRINK, M.; WEERHEIJM, K.; MARÍÑO, R. *et al.* A practical method for use in epidemiological studies on enamel hypomineralisation. **European Archives of Paediatric Dentistry** v. 16, n. 3, p. 235-246, 2015.

GOLSHAN-TAFTI, M.; DASTGHEIB, S. A.; BAHRAMI, R.; AARAFI, H. *et al.* A comprehensive consolidation of data on the relationship between IRF6 polymorphisms and non-syndromic cleft lip/palate susceptibility: From 79 case-control studies. **Journal of stomatology, oral and maxillofacial surgery**, v. p. 101809, 2024.

GUIMARÃES, G. N.; RODRIGUES, T. L.; DE SOUZA, A. P.; LINE, S. R. *et al.* Parathyroid hormone (1-34) modulates odontoblast proliferation and apoptosis via PKA and PKC-dependent pathways. **Calcified Tissue International**, v. 95, n. 3, p. 275-281, 2014.

HAMMOND, N. L.; DIXON, M. J. Revisiting the embryogenesis of lip and palate development. **Oral diseases**, v. 28, n. 5, p. 1306-1326, 2022.

HERKRATH, A. P.; HERKRATH, F. J.; REBELO, M. A.; VETTORE, M. V. Parental age as a risk factor for non-syndromic oral clefts: a meta-analysis. **Journal of dentistry**, v. 40, n. 1, p. 3-14, 2012.

HOUARI, S.; LOIODICE, S.; JEDEON, K.; BERDAL, A. *et al.* Expression of Steroid Receptors in Ameloblasts during Amelogenesis in Rat Incisors. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 503, 2016.

HOVORAKOVA, M.; LESOT, H.; PETERKA, M.; PETERKOVA, R. Early development of the human dentition revisited. **Journal of anatomy**, v. 233, n. 2, p. 135-145, 2018.

HOWE, B. J.; COOPER, M. E.; VIEIRA, A. R.; WEINBERG, S. M. *et al.* Spectrum of Dental Phenotypes in Nonsyndromic Orofacial Clefting. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 7, p. 905-912, 2015.

HOWE, B. J.; PENDLETON, C.; WITHANAGE, M. H. H.; CHILDS, C. A. *et al.* Tooth Agenesis Patterns in Orofacial Clefting Using Tooth Agenesis Code: A Meta-Analysis. **Dentistry Journal**, v. 10, n. 7, 2022.

IAMAROON, A.; TAIT, B.; DIEWERT, V. M. Cell proliferation and expression of EGF, TGF- α , and EGF receptor in the developing primary palate. **Journal of Dental Research**, v. 75, n. 8, p. 1534-1539, 1996.

ITO, Y.; YEO, J. Y.; CHYTIL, A.; HAN, J. *et al.* Conditional inactivation of *Tgfb β 2* in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. **Development** v. 130, n. 21, p. 5269-5280, 2003.

ITTISOPONPISAN, S.; ALHUZIMI, E.; STERNBERG, M. J.; DAVID, A. Landscape of Pleiotropic Proteins Causing Human Disease: Structural and System Biology Insights. **Human mutation**, v. 38, n. 3, p. 289-296, 2017.

JÄLEVIK, B.; SABEL, N.; ROBERTSON, A. Can molar incisor hypomineralization cause dental fear and anxiety or influence the oral health-related quality of life in children and adolescents?-a systematic review. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 23, n. 1, p. 65-78, 2022.

JORGE, R. C.; REIS, P.; SOVIERO, V. M. Understanding the Enamel Disintegration and Posteruptive Breakdown of Demarcated Opacities on Molar Incisor Hypomineralisation. **Monographs in Oral Science**, v. 32, p. 88-99, 2024.

KAN, S.; ZHU, G.; DU, Y.; FAN, L. *et al.* Non-syndromic cleft lip with or without palate-susceptible SNPs is associated with hyperdontia. **Oral diseases**, v. 25, n. 7, p. 1751-1758, 2019.

KARKI, R.; PANDYA, D.; ELSTON, R. C.; FERLINI, C. Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. **BMC Medical Genomics**, v. 8, p. 37, 2015.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Desenvolvimento Craniofacial. *In*: KATCHBURIAN, E. e ARANA, V. (Ed.). **Histologia e Embriologia Oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara

Koogan, 2023a. cap. 1, p. 1-9. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788527739757/>. Acesso em: 2 Jul 2025.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Odontogênese. *In*: KATCHBURIAN, E. e ARANA, V. (Ed.). **Histologia e Embriologia Oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023b. cap. 6, p. 101-122. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788527739757/>. Acesso em: 2 Jul 2025.

KHALAF, K.; MISKELLY, J.; VOGUE, E.; MACFARLANE, T. V. Prevalence of hypodontia and associated factors: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Orthodontics**, v. 41, n. 4, p. 299-316, 2014.

KHANNA-JAIN, R.; VUORINEN, A.; SÁNDOR, G. K.; SUURONEN, R. *et al.* Vitamin D(3) metabolites induce osteogenic differentiation in human dental pulp and human dental follicle cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, n. 4, p. 133-141, 2010.

KIM, H. E.; HONG, J. H. The overview of channels, transporters, and calcium signaling molecules during amelogenesis. **Archives of Oral Biology**, v. 93, p. 47-55, 2018.

KIRSCHNECK, M.; ZBIDAT, N.; PADDENBERG, E.; REIS, C. L. B. *et al.* Transforming Growth Factor Beta Receptor 2 (TGFB2) Promoter Region Polymorphisms May Be Involved in Mandibular Retrognathism. **BioMed research international**, v. 2022, p. 1503052, 2022.

KONSTANTONIS, D.; NASSIKA, M.; ATHANASIOU, M.; VASTARDIS, H. Subphenotypes in Non-Syndromic Orofacial Cleft Patients Based on the Tooth Agenesis Code (TAC). **Children**, v. 9, n. 3, 2022.

KOROLENKOVA, M. V.; STARIKOVA, N. V.; UDALOVA, N. V. The role of external aetiological factors in dental anomalies in non-syndromic cleft lip and palate patients. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 20, n. 2, p. 105-111, 2019.

KRIVICKA, B.; PILMANE, M.; AKOTA, I. Expression of growth factors and growth factor receptors in human cleft-affected tissue. **Stomatologija**, v. 15, n. 4, p. 111-118, 2013.

KRONMILLER, J. E. Spatial distribution of epidermal growth-factor transcripts and effects of exogenous epidermal growth factor on the pattern of the mouse dental lamina. **Archives of Oral Biology**, v. 40, n. 2, p. 137-143, 1995.

KÜCHLER, E. C.; CARELLI, J.; MORAIS, N. D.; BRANCHER, J. A. *et al.* Assessing the association between vitamin D receptor and dental age variability. **Clinical Oral Investigations**, v. 26, n. 2, p. 1677-1682, 2022.

KÜCHLER, E. C.; DA MOTTA, L. G.; VIEIRA, A. R.; GRANJEIRO, J. M. Side of dental anomalies and taurodontism as potential clinical markers for cleft subphenotypes. **The Cleft Palate-Craniofacial Journal**, v. 48, n. 1, p. 103-108, 2011.

KÜCHLER, E. C.; REIS, C. L. B.; SILVA-SOUSA, A. C.; MARAÑÓN-VÁSQUEZ, G. A. *et al.* Exploring the Association Between Genetic Polymorphisms in Genes Involved in Craniofacial Development and Isolated Tooth Agenesis. **Frontiers in physiology**, v. 12, p. 723105, 2021.

LAAGER, R.; GREGORIANO, C.; HAUSER, S.; KOEHLER, H. *et al.* Hospitalization Trends for Airway Infections and In-Hospital Complications in Cleft Lip and Palate. **JAMA Network Open**, v. 7, n. 9, p. e2428077, 2024.

LARA, L. D. S.; COLETTA, R. D.; ASSIS MACHADO, R.; QUERINO ROCHA DE OLIVEIRA, L. *et al.* Exploring the role of the WNT5A rs566926 polymorphism and its interactions in non-syndromic orofacial cleft: a multicenter study in Brazil. **Journal of Applied Oral Science**, v. 32, p. e20230353, 2024.

LAVÔR, J. R.; LACERDA, R. H. W.; MODESTO, A.; VIEIRA, A. R. Maxillary incisor enamel defects in individuals born with cleft lip/palate. **PloS One**, v. 15, n. 12, p. e0244506, 2020.

LESLIE, E. J. Genetic models and approaches to study orofacial clefts. **Oral diseases**, v. 28, n. 5, p. 1327-1338, 2022.

LIANG, J.; HOFF, J.; LANGE, J.; REN, Y. *et al.* MSX1 mutations and associated disease phenotypes: genotype-phenotype relations. v. 24, p. 1663-1670, 2016.

LOPES-FATTURI, A.; FONSECA-SOUSA, G.; WAMBIER, L. M.; BRANCHER, J. A. *et al.* Genetic polymorphisms associated with developmental defects of enamel: A systematic review. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 35, n. 2, p. 298-310, 2024.

MACHADO, R. A.; DE OLIVEIRA, L. Q. R.; RANGEL, A.; REIS, S. R. A. *et al.* Brazilian Multiethnic Association Study of Genetic Variant Interactions among FOS, CASP8, MMP2 and CRISPLD2 in the Risk of Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate. **Dentistry Journal**, v. 11, n. 1, 2022.

MACHADO, R. A.; MARTELLI, D. R. B.; REIS, S. R. A.; RICCI VOLPATO, L. E. *et al.* A Large Multicenter Brazilian Case-Control Study Exploring Genetic Variations in Interferon Regulatory Factor 6 and the Risk of Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 7, 2025.

MADALENA, I. R.; KÜCHLER, E. C.; REIS, C. L. B.; MATSUMOTO, M. A. N. *et al.* Association of PTH and vitamin D-related genes with dental development in Brazilian children: a cross-sectional study. **Brazilian Oral Research**, v. 39, p. e033, 2025.

MADALENA, I. R.; REIS, C. L. B.; MATSUMOTO, M. A. N.; STUANI, M. B. S. *et al.* Investigating the association between dental age and polymorphisms in genes encoding estrogen receptors. **Journal Of Applied Oral Science**, v. 31, p. e20230184, 2023.

MANGIONE, F.; NGUYEN, L.; FOUMOU, N.; BOCQUET, E. *et al.* Cleft palate with/without cleft lip in French children: radiographic evaluation of prevalence, location and coexistence of dental anomalies inside and outside cleft region. **Clinical oral investigations**, v. 22, n. 2, p. 689-695, 2018.

MARTINELLI, M.; PALMIERI, A.; CARINCI, F.; SCAPOLI, L. Non-syndromic Cleft Palate: An Overview on Human Genetic and Environmental Risk Factors. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 592271, 2020.

MASSAGUÉ, J. How cells read TGF-beta signals. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 3, p. 169-178, 2000.

MEADE, M. J.; DREYER, C. W. Tooth agenesis: An overview of diagnosis, aetiology and management. **The Japanese Dental Science Review**, v. 59, p. 209-218, 2023.

MENDONÇA, F. L.; GRIZZO, I. C.; ALENCAR, C. R. B.; RIOS, D. Restorative Therapy of MIH-Affected Molars. **Monographs in Oral Science**, v. 32, p. 236-260, 2024.

MIETTINEN, P. J.; CHIN, J. R.; SHUM, L.; SLAVKIN, H. C. *et al.* Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. **Nature Genetics**, v. 22, n. 1, p. 69-73, 1999.

MOSSEY, P. A.; CATILLA, E. E. **Global registry and database on craniofacial anomalies : report of a WHO Registry Meeting on Craniofacial Anomalies** Geneva: World Health Organization, 2003. 9241591102. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/42840>. Acesso em: mai 2025.

MOSSEY, P. A.; LITTLE, J.; MUNGER, R. G.; DIXON, M. J. *et al.* Cleft lip and palate. **Lancet (London, England)**, v. 374, n. 9703, p. 1773-1785, 2009.

MOTSINGER, A. A.; RITCHIE, M. D. Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. **Human Genomics**, v. 2, n. 5, p. 318-328, 2006.

MUNDRA, L. S.; LOWE, K. M.; KHECHOYAN, D. Y. Alveolar Bone Graft Timing in Patients With Cleft Lip & Palate. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 33, n. 1, p. 206-210, 2022.

NANCI, A. Embriologia da Cabeça, da Face e da Cavidade Oral. In: NANCI, A. (Ed.). **Ten Cate - Histologia Oral**. 9 ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 02 jul 2025 2019a. cap. 3. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595150386/>.

NANCI, A. Desenvolvimento do Dente e de seus Tecidos de Suporte. In: NANCI, A. (Ed.). **Ten Cate - Histologia Oral**. 9 ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 02 jul 2025 2019b. cap. 5, p. 67-89. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595150386/>.

NIREEKSHA, N.; HEGDE, M. N.; SHETTY, S. S.; KUMARI, S. N. FOK I Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Risk of Dental Caries: A Case-Control Study. **International Journal of Dentistry**, v. 2022, p. 6601566, 2022.

PARK, T. H.; LIN, J. H.; CHUNG, C. H.; ZHENG, Z. *et al.* The skeletal and dental age advancements of children and adolescents with overweight and obesity: A systematic review

and meta-analysis. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 164, n. 3, p. 325-339, 2023.

PARTANEN, A. M.; EKBLÖM, P.; THESLEFF, I. Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. **Developmental biology**, v. 111, n. 1, p. 84-94, 1985.

PHAN, M.; CONTE, F.; KHANDELWAL, K. D.; OCKELOEN, C. W. *et al.* Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arms? **Human genetics**, v. 135, n. 12, p. 1299-1327, 2016.

RUIZ, L. A.; MAYA, R. R.; D'ALPINO, P. H.; ATTA, M. T. *et al.* Prevalence of enamel defects in permanent teeth of patients with complete cleft lip and palate. **The Cleft Palate-Craniofacial Journal** v. 50, n. 4, p. 394-399, 2013.

SÁ, J.; MARIANO, L. C.; CANGUÇU, D.; COUTINHO, T. S. *et al.* Dental Anomalies in a Brazilian Cleft Population. **The Cleft Palate-Craniofacial Journal** v. 53, n. 6, p. 714-719, 2016.

SADEGHI, M.; GOLSHAH, A.; GODINY, M.; SHARIFI, R. *et al.* The Most Common Vitamin D Receptor Polymorphisms (ApaI, FokI, TaqI, BsmI, and BglII) in Children with Dental Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Children** v. 8, n. 4, 2021.

SAKAKURA, Y.; FUJIWARA, N.; SUGAWARA, M.; NAWA, T. In vitro effects of calcitonin and/or parathyroid hormone on odontogenesis of mouse embryonic molars. **Journal of Dental Research**, v. 68, n. 8, p. 1279-1284, 1989.

SALARI, N.; DARVISHI, N.; HEYDARI, M.; BOKAEE, S. *et al.* Global prevalence of cleft palate, cleft lip and cleft palate and lip: A comprehensive systematic review and meta-analysis. **Journal of stomatology, oral and maxillofacial surgery**, v. 123, n. 2, p. 110-120, 2022.

SANTOS, P. S.; VITALI, F. C.; FONSECA-SOUZA, G.; MAIA, L. C. *et al.* Dentin hypersensitivity and toothache among patients diagnosed with Molar-Incisor Hypomineralization: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dentistry**, v. 145, p. 104981, 2024.

SHASTRY, B. S. SNPs: impact on gene function and phenotype. **Methods in Molecular Biology** v. 578, p. 3-22, 2009.

SPINA, V. A proposed modification for the classification of cleft lip and cleft palate. **The Cleft palate journal**, v. 10, p. 251-252, 1973.

STEARNS, F. W. One hundred years of pleiotropy: a retrospective. **Genetics**, v. 186, n. 3, p. 767-773, 2010.

TALAL ALSHARIF, M.; ABDULLAH ALAMOUDI, R.; JAFAR SABBAGH, H. Maternal stress as a risk factor for non-syndromic orofacial clefts: Systematic review and meta-analysis. **The Saudi dental journal**, v. 35, n. 3, p. 207-219, 2023.

TARR, J. T.; LAMBI, A. G.; BRADLEY, J. P.; BARBE, M. F. *et al.* Development of Normal and Cleft Palate: A Central Role for Connective Tissue Growth Factor (CTGF)/CCN2. **Journal of Developmental Biology**, v. 6, n. 3, 2018.

TORLIŃSKA-WALKOWIAK, N.; MAJEWSKA, K. A.; KĘDZIA, A.; OPYDO-SZYMACZEK, J. Clinical Implications of Growth Hormone Deficiency for Oral Health in Children: A Systematic Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 16, 2021.

VAN DYCK, J.; CADENAS DE LLANO-PÉRULA, M.; WILLEMS, G.; VERDONCK, A. Dental development in cleft lip and palate patients: A systematic review. **Forensic science international**, v. 300, p. 63-74, 2019.

VIEIRA, K. M.; MENEZES, V. C.; CARDOSO-DOS-SANTOS, A. C.; FRANCO, A. *et al.* Orofacial clefts in newborns in Brazil: a time series study, 2010-2021. **Epidemiologia e Serviços de Saúde: Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 34, p. e20240027, 2025.

VOLTAN, G.; CANNITO, M.; FERRARESE, M.; CECCATO, F. *et al.* Vitamin D: An Overview of Gene Regulation, Ranging from Metabolism to Genomic Effects. **Genes**, v. 14, n. 9, 2023.

WANDERLEY LACERDA, R. H.; FILGUEIRAS, V. M.; GUEDES MENDONÇA, A. C.; VIEIRA, A. R. Molar-incisor hypomineralization in a cohort of individuals born with cleft lip and palate. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v. 27 Suppl 1, p. 21-26, 2024.

YAPIJAKIS, C.; DAVARIA, S.; GINTONI, I.; CHROUSOS, G. P. The Impact of Genetic Variability of TGF-Beta Signaling Biomarkers in Major Craniofacial Syndromes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1423, p. 187-191, 2023.

ZENG, F.; HARRIS, R. C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 28, p. 2-11, 2014.

ZHANG, W.; QU, H. C.; ZHANG, Y. Association of MSX1 and TGF- β 1 genetic polymorphisms with hypodontia: meta-analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 10007-10016, 2014.

ZHANG, X.; BECK, P.; RAHEMTULLA, F.; THOMAS, H. F. Regulation of enamel and dentin mineralization by vitamin D receptor. **Frontiers of Oral Biology**, v. 13, p. 102-109, 2009.

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- PAIS E/OU RESPONSÁVEL LEGAL

A criança/ o(a) adolescente _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado por nós, Juliana Feltrin de Souza, Rafaela Scariot de Moraes, Aluhê Lopes Fatturi e Gabriela Fonseca de Souza da Universidade Federal do Paraná, a participar de um estudo intitulado **“Condições bucais associadas às fissuras lábio palatais na infância: Anomalias dentárias e fatores genéticos.”** Este estudo é importante para que possamos avaliar o impacto das fissuras lábio palatais na vida da criança e do adolescente do ponto de vista da saúde bucal.

- a. O objetivo dessa pesquisa é avaliar as condições bucais de crianças e adolescentes com fissuras lábio palatais.
- b. Caso o(a) senhor(a) autorize a participação de seu(sua) filho(a), será necessário que você responda verbalmente a um questionário que será aplicado previamente a consulta odontológica de seu(sua) filho(a). Além disso, seu filho(a) participará de um exame bucal realizado no ambiente do CAIF, onde também será coletado a saliva do mesmo, para avaliar as possíveis associações genéticas da fissura lábio palatal.
- c. Para tanto você e seu filho(a) deverão estar presentes no CAIF para sua consulta de rotina (Avenida República Argentina, 4334, bairro Novo Mundo, Curitiba – PR, CEP 81050-000), para responder ao questionário, realização do exame bucal e coleta de saliva, o que levará aproximadamente 10 minutos.
- d. É possível que o(a) senhor(a) apresente algum desconforto ou constrangimento em responder ao questionário. No entanto, caso alguma destas possibilidades ocorra, o senhor(a) poderá optar por deixar a resposta em branco em questões que possam lhe constranger, ou suspender imediatamente o preenchimento do questionário. Em relação ao exame bucal e coleta de saliva, estes não oferecerão riscos ao(a) seu(sua) filho(a). Na eventualidade de seu(sua) filho(a) mostrar-se contrário(a) a realização do exame ou constrangido(a), este será interrompido imediatamente.
- e. Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser a presença de desconforto, constrangimento e cansaço durante a aplicação do questionário, ou no decorrer do exame bucal e coleta de saliva que serão realizados em seu(sua) filho(a). O tempo necessário para responder o questionário será de aproximadamente 15 minutos e o exame bucal levará cerca de 5 minutos.
- f. Os benefícios esperados com essa pesquisa são: caso seu filho(a) apresentar alguma alteração na boca que indique necessidade de tratamento, você será informado(a) e orientado(a) a levar seu(sua) filho(a) para buscar atendimento nas clínicas de Odontologia da Universidade Federal do Paraná. Indiretamente, os resultados desta pesquisa poderão beneficiar a sociedade e pacientes com fissuras lábio palatais, uma vez que estratégias de prevenção e tratamento podem ser adotadas focadas nas necessidades destes pacientes, e assim, reduzir o impacto negativo das fissuras e alterações decorrentes destas na qualidade de vida desses pacientes.
- g. Os pesquisadores Juliana Feltrin de Souza Caparroz, Rafaela Scariot de Moraes, Aluhê Lopes Fatturi e Gabriela Fonseca de Souza, responsáveis por esse estudo poderão ser localizados no Campus Botânico da Universidade Federal do Paraná (Av. Prefeito Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, CEP 80210-170), no Departamento de Estomatologia ou pelos e-mails: julianafeltrin@hotmail.com, rafaela_scariot@yahoo.com.br, aluhe.odonto@gmail.com e/ou gbfonsecadesouza@gmail.com, ou ainda pelo telefone (41) 3360-4025, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, durante ou depois do encerramento do estudo.
- h. A sua participação e de seu(sua) filho(a) neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB nº 375-2472
na data de 09/12/2019

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal [rubrica]
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE [rubrica]
Orientador [rubrica]

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD Rua
Padre Camargo, 285 | 1º andar |
Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 | cometica.saude@ufpr.br – telefone (041) 3360-7259

- i. As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas (professora orientadora e alunas). No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade e de seu(sua) filho(a) seja preservada e mantida sua confidencialidade.**
- j. O material obtido – questionário e ficha de exame clínico odontológico – será utilizado unicamente para essa pesquisa e será incinerado após 03 anos do término do estudo. As amostras de saliva serão descartadas de forma apropriada como material biológico após análise.
- k. As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames e questionários) não são de sua responsabilidade e você ou seu filho(a) não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.
- l. Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código)
- m. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão colegiado multi e transdisciplinar, independente, que existe nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil e foi criado com o objetivo de proteger os participantes de pesquisa, em sua integridade e dignidade, e assegurar que as pesquisas sejam desenvolvidas dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde).

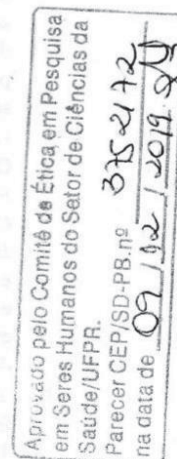
Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, _____ de _____ de _____.

[Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal]

Gabriela Jovisco de Naga

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE]



APÊNDICE 2 - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

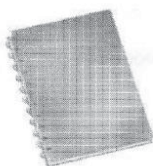
TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Crianças de 07 a 12 anos)

Nós, Juliana Feltrin de Souza, Rafaela Scariot de Moraes, Aluhê Lopes Fatturi e Gabriela Fonseca de Souza, convidamos você _____, a participar do estudo “Condições bucais associadas às fissuras lábio palatais na infância: Anomalias dentárias e fatores genéticos.”

Por que estamos propondo este estudo? Para avaliar o que as fissuras lábio palatais podem causar na saúde bucal e na vida de crianças e adolescentes.

O que significa assentimento ?



Assentimento é um termo que nós, pesquisadores, utilizamos quando convidamos uma pessoa da sua idade (criança) para participar de um estudo. Depois de compreender do que se trata o estudo e se concordar em participar dele você pode assinar este documento.

Nós te asseguramos que você terá todos os seus direitos respeitados e receberá todas as informações sobre o estudo, por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado Termo de Assentimento Livre e Esclarecido contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável (pela pesquisa/atendimento ou à equipe do estudo) para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Por que queremos fazer este estudo?

Para avaliar o que as fissuras lábio palatais podem causar na saúde bucal e na vida de crianças e adolescentes e para encontrar melhores formas de prevenção e tratamentos de problemas bucais que possam estar ligados às fissuras.



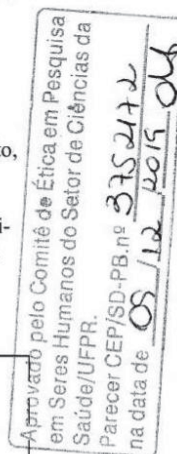
Nós iremos realizar um exame da sua boca, colher um pouco de sua saliva e você irá responder algumas perguntas sobre sua qualidade de vida. O exame de sua boca irá durar mais ou menos 5 minutos e para responder às perguntas do questionário você vai gastar perto de 15 minutos. Você poderá sentir algum desconforto na coleta de saliva e quando for feita a avaliação de sua boca.

Os benefícios da pesquisa são: caso você tenha alguma alteração em sua boca que precise de tratamento, você e seu responsável serão orientados para procurar atendimento nas Clínicas de Odontologia da Universidade Federal do Paraná. Além disso, essa pesquisa poderá ajudar outras crianças com fissuras lábio palatais, pois ao conhecermos as suas necessidades, poderemos encontrar melhores formas preveni-las e trata-las, diminuindo os efeitos negativos que elas podem causar na vida de pacientes com fissuras.

Participante da Pesquisa [rubrica]

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TALE [rubrica]

Orientador [rubrica]



Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | 1º andar |
Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 | cometica.saude@ufpr.br – telefone (041) 3360-7259

Se você ou os responsáveis por você tiverem dúvidas com relação ao estudo ou aos riscos relacionados a ele, você deve contatar o pesquisador principal ou membro de sua equipe Juliana Feltrin de Souza Caparroz (julianafeltrin@hotmail.com), Rafaela Scariot de Moraes (rafaela_scariot@yahoo.com.br), Aluhê Lopes Fatturi (aluhe.odonto@gmail.com) e Gabriela Fonseca de Souza (gbfonsecadesouza@gmail.com) pelo telefone (41) 3360-4025 ou no endereço Av. Prefeito Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, CEP 80210-170 (Universidade Federal do Paraná, Campus Jd. Botânico, Departamento de Estomatologia).

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.



Mas, se você não se sentir confortável em participar, fique à vontade para dizer não e estará tudo bem.

Se em algum momento não tiver mais interesse em participar da pesquisa, pode pedir para seus pais ou responsáveis comunicarem os pesquisadores.

Você entendeu? Quer perguntar mais alguma coisa



DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PARTICIPANTE

Eu li e discuti com o pesquisador responsável sobre este estudo e os detalhes deste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

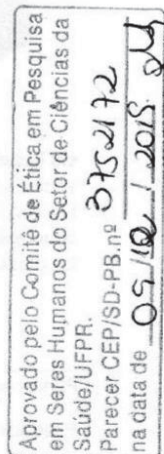
Eu receberei uma cópia assinada e datada deste documento.

[Assinatura da criança]

Curitiba, _____ de _____ de _____.

Gabriela Fonseca de Souza.

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TALE]



APÊNDICE 3 - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE CÉLULAS DA MUCOSA ORAL

O presente protocolo de extração de DNA foi desenvolvido com base nos métodos descritos por Aidar e Line (2007) e Kückler et al. (2012), com adaptações às condições laboratoriais utilizadas neste estudo.

Coleta e Armazenamento da Amostra de Saliva

1. Adicionar 5 mL de soro fisiológico em um copo plástico descartável e solicitar que a criança realize bochechos vigorosos durante 1 minuto.
2. Orientar a criança a cuspir todo o conteúdo no copo.
3. Utilizar uma espátula de madeira estéril para raspar a mucosa jugal direita e esquerda. A raspagem deve ser feita de forma vigorosa, porém cuidadosa, a fim de evitar lesões (Figura 1). Utilizar um lado da espátula para cada lado da mucosa e, ao final, agitar levemente a espátula na saliva coletada no copo para garantir a transferência das células.
4. Transferir o conteúdo do copo para um tubo Falcon.
5. Adicionar 3 mL de uma solução fixadora⁵ à amostra.
6. Armazenar os tubos em geladeira a 4 °C até a etapa de extração.

FIGURA 1 – Raspagem da mucosa jugal.



Fonte: A autora (2023).

⁵ **Solução fixadora:** 66% de etanol absoluto e 34% de solução contendo 17 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM NaCl e 7 mM EDTA.

Extração do DNA

O processo completo de extração ocorre em dois dias.

Dia 1

1. Centrifugar as amostras por 10 minutos a 3.000 rpm, garantindo que os tubos conttenham volumes equivalentes para manter o equilíbrio na centrífuga (Figura 2A e 2B).
2. Descartar cuidadosamente o sobrenadante, preservando o pellet no fundo do tubo (um pequeno volume de sobrenadante pode permanecer; não bater o tubo).
3. Adicionar 1 mL da solução de lise⁶, lavando o pellet por meio de sucessivas aspirações e dispensações com a pipeta (injeção e retirada da solução no tubo Falcon).
4. Adicionar 10 μ L de proteinase K⁷ (20 mg/mL) em cada tubo Falcon, repetindo o mesmo procedimento de lavagem.
5. Incubar os tubos em banho-maria a 60 °C por aproximadamente 12 horas (overnight) (Figura 2C), mantendo-os fixos em uma estante apropriada para evitar que boiem durante a incubação.

FIGURA 2 – (2A) Centrífuga para tubos Falcon; (2B) Vista interna da centrífuga com os tubos Falcon dispostos em equilíbrio; (2C) Banho-maria.



Fonte: A autora (2025).

Dia 2

1. Transferir o conteúdo de cada tubo Falcon para microtubos Eppendorf de 2 mL, devidamente identificados com os códigos das respectivas amostras.

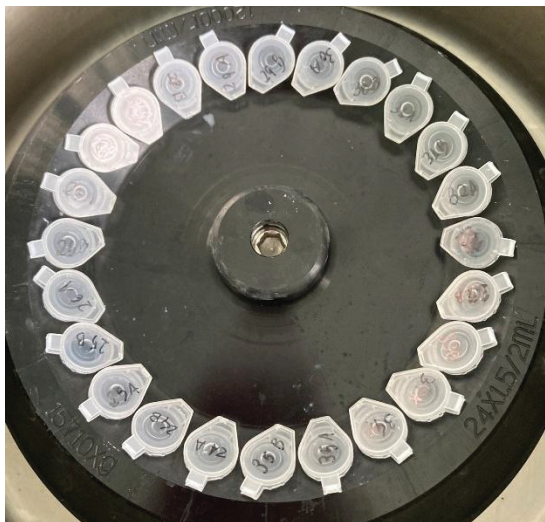
⁶ **Solução de lise:** 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 5 mM EDTA.

⁷ **Proteinase K (20 mg/mL):** preparada em tampão contendo 10 mM Tris, 20 mM cloreto de cálcio (CaCl_2) e 30% de glicerol.

2. Adicionar 470 μL de acetato de amônio⁸ (à temperatura ambiente) a cada tubo.
3. Centrifugar por 16 minutos a 13.000 rpm.

*As “asas” dos microtubos devem ficar voltadas para fora (Figura 3).

FIGURA 3 – Posicionamento dos microtubos na centrífuga.



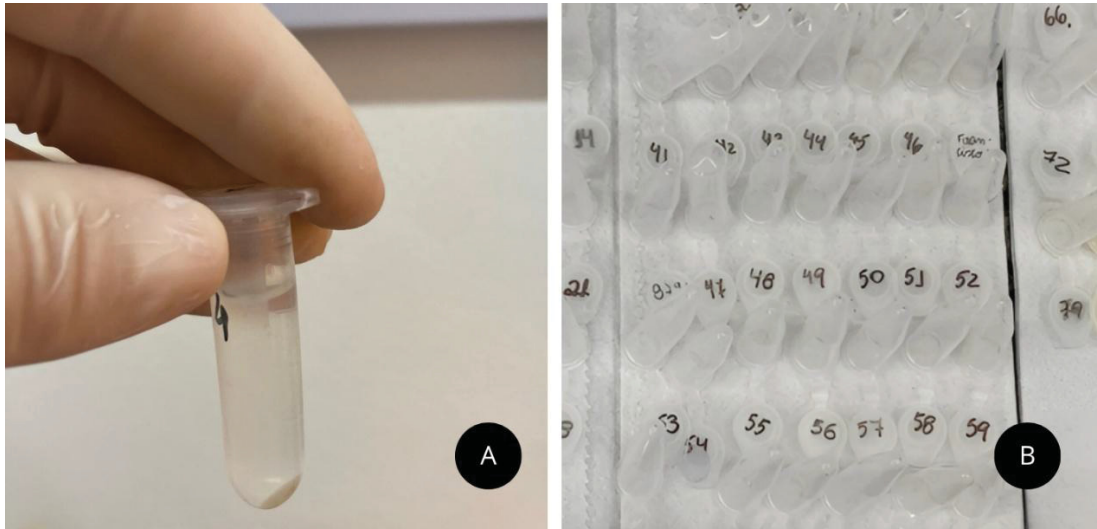
Fonte: A autora (2025).

4. Transferir cuidadosamente o sobrenadante (contendo o DNA em suspensão) para dois microtubos Eppendorf de 1,5 mL, adicionando 800 μL em cada. Evitar tocar ou aspirar o pellet (Figura 3A).
 - Identificar os tubos como “A” e “B”, por exemplo: 1A e 1B.
5. Descartar o tubo que contém o pellet (rica em proteínas e restos celulares).
6. Adicionar 540 μL de isopropanol a cada tubo.
7. Homogeneizar delicadamente, invertendo os tubos 20 vezes.
8. Centrifugar por 7 minutos a 13.000 rpm.
9. Descartar o sobrenadante com isopropanol.
10. Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado.
11. Centrifugar por 7 minutos a 13.000 rpm.
12. Descartar o etanol com cuidado e remover o excesso de líquido do fundo do tubo sem tocar no pellet.
13. Deixar os tubos secando em temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas ou até a completa evaporação do álcool. Se necessário, deixar secar durante a noite (Figura 3B).
14. Após completa secagem, adicionar 50 μL de tampão de eluição⁹ em cada tubo.
15. Armazenar os tubos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

FIGURA 4 – (4A) Aspecto da amostra após centrifugação, com o pellet visível no fundo do microtubo Eppendorf, o qual não deve ser tocado; (4B) Tubos dispostos para secagem em temperatura ambiente.

⁸ **Solução de acetato de amônio:** 8 M acetato de amônio e 1 mM EDTA.

⁹ **Tampão de eluição:** 10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7,6).



Fonte: A autora (2025).

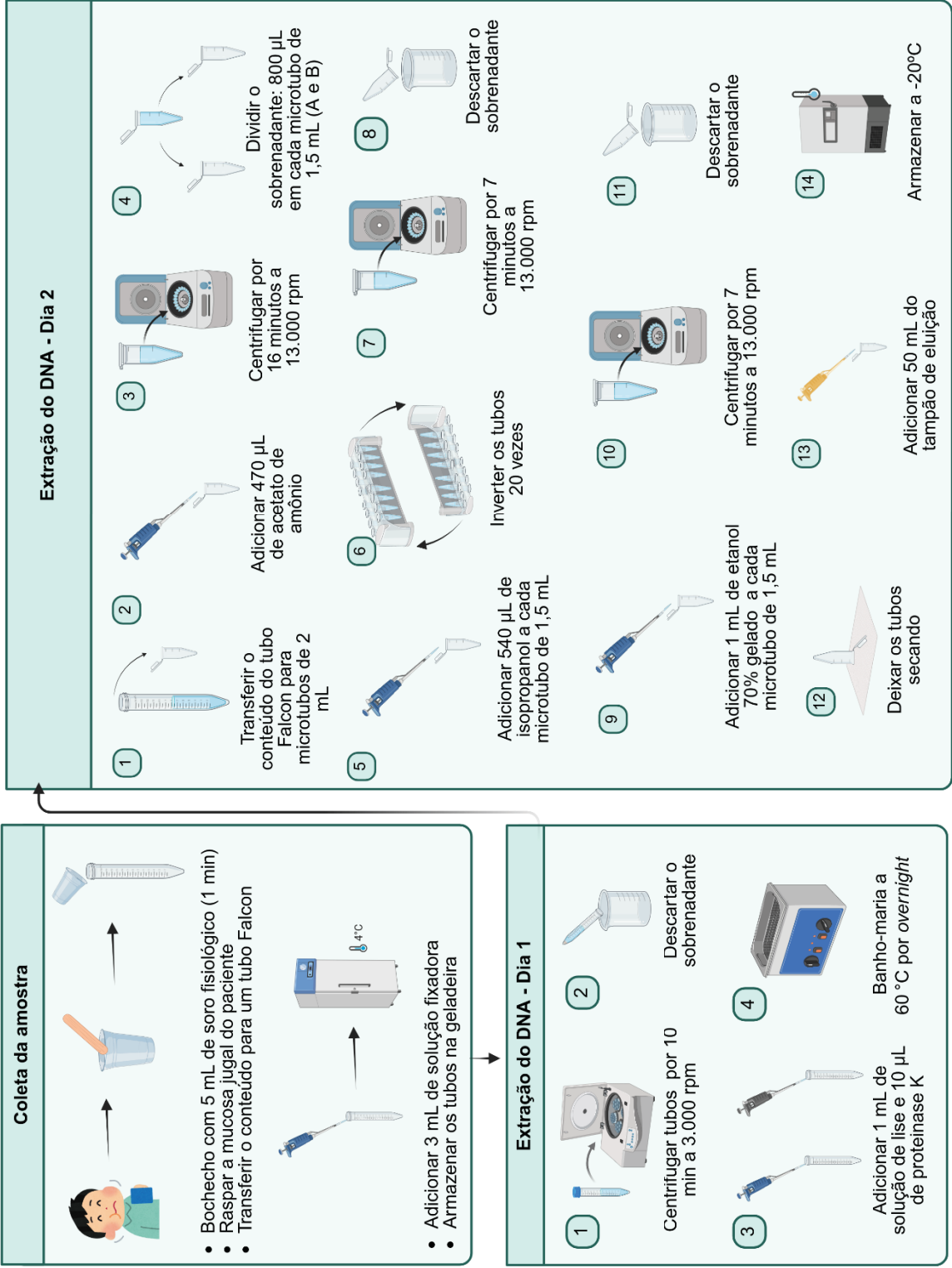
A Figura 5, apresentada ao final deste apêndice, resume esquematicamente as principais etapas do protocolo descrito.

Referências

AIDAR, M.; LINE, S. R. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. **Brazilian Dental journal**, v. 18, n. 2, p. 148-152, 2007.

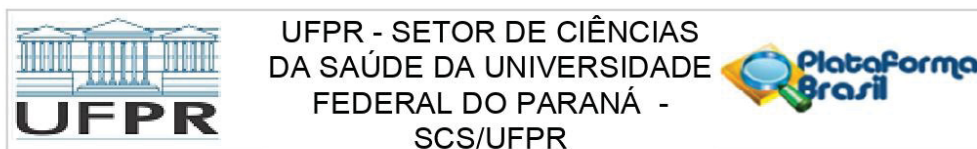
KÜCHLER, E. C.; TANNURE, P. N.; FALAGAN-LOTSCH, P.; LOPES, T. S. *et al.* Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 4, p. 467-471, 2012.

FIGURA 5 – Sequência esquemática e resumida das principais etapas envolvidas no protocolo de extração de DNA.



Fonte: A autora (2025). Imagem criada em <https://BioRender.com>.

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – UFPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Condições bucais associadas às fissuras lábio palatais na infância: Anomalias dentárias e fatores genéticos.

Pesquisador: Juliana Feltrin de Souza Caparroz

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 21210619.0.0000.0102

Instituição Proponente: Departamento de Estomatologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.752.172

Apresentação do Projeto:

Trata-se de análise de pendências de protocolo de pesquisa de título: "Condições bucais associadas às fissuras lábio palatais na infância: Anomalias dentárias e fatores genéticos", apresentado pelo Departamento de Estomatologia sob responsabilidade da Profa. Juliana Feltrin de Souza Caparroz com colaboração de RAFAELA SCARIOT DE MORAES, ALUHÉ LOPES FATTURI, GABRIELA FONSECA DE SOUZA.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo caso controle é avaliar a condição bucal de crianças e adolescentes com fissuras lábio palatais, bem como avaliar a relação entre fissuras lábio palatais com as anomalias dentárias, defeitos de desenvolvimento do esmalte, má-oclusão, a experiência de cárie dentária e qualidade de vida relacionada à saúde bucal. Ainda pretende-se avaliar se há associação entre fissuras lábio palatais e as anomalias dentárias com polimorfismos genéticos.

1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a condição bucal de crianças e adolescentes com fissuras lábio palatais;

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -
SCS/UFPR



Continuação do Parecer: 3.752.172

Não

CURITIBA, 09 de Dezembro de 2019

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

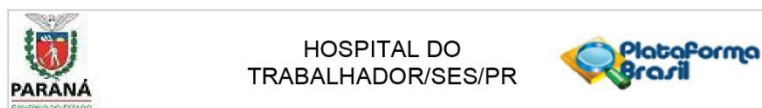
UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ/HOSPITAL DO TRABALHADOR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Condições bucais associadas às fissuras lábio palatais na infância: Anomalias dentárias e fatores genéticos.

Pesquisador: Juliana Feltrin de Souza Caparroz

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 21210619.0.3001.5225

Instituição Proponente: Secretaria de Estado da Saúde do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.918.552

Apresentação do Projeto:

Trata-se da resposta a pendências levantadas no parecer 3.817.020.

Objetivo da Pesquisa:

Já comentado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já avaliados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já comentados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi incluído o termo de anuência institucional de acordo com o solicitado.

O orçamento também foi explicitado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma pendência ética significativa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Relembremos os autores que devem ser encaminhados como NOTIFICAÇÃO os seguintes assuntos:

- Relatórios parciais (semestrais), se for o caso

Endereço: Hospital do Trabalhador Avenida República Argentina, 4406 - Novo Mundo - 81.050-000 - Curitiba - PR 41
Bairro: Novo Mundo **CEP:** 81.050-000
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3212-5871 **E-mail:** cepht@sesa.pr.gov.br

Continuação do Parecer: 3.918.552

Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_7_12.docx	21:57:54	de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_13_17.docx	16/09/2019 21:57:37	Gabriela Fonseca de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PAIS.docx	16/09/2019 21:57:20	Gabriela Fonseca de Souza	Aceito
Outros	Concordancia_laboratorio.pdf	16/09/2019 21:56:59	Gabriela Fonseca de Souza	Aceito
Outros	Concordancia_dpto_estomato.pdf	16/09/2019 21:56:32	Gabriela Fonseca de Souza	Aceito
Outros	ATA_dpto_estomato.pdf	16/09/2019 21:55:24	Gabriela Fonseca de Souza	Aceito
Outros	Solicitacao_acesso_dados.pdf	04/09/2019 15:23:58	Gabriela Fonseca de Souza	Aceito
Outros	Compromisso_dados_arquivo.pdf	04/09/2019 15:21:17	Gabriela Fonseca de Souza	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_guarda_material_biologico.pdf	04/09/2019 15:11:17	Gabriela Fonseca de Souza	Aceito
Outros	Autorizacao_manipulacao_dados.pdf	04/09/2019 15:08:37	Gabriela Fonseca de Souza	Aceito
Outros	Analise_do_merito.pdf	04/09/2019 14:53:34	Gabriela Fonseca de Souza	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento.pdf	04/09/2019 14:47:58	Gabriela Fonseca de Souza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 16 de Março de 2020

Assinado por:
FABIO TERABE
(Coordenador(a))

Endereço: Hospital do Trabalhador Avenida República Argentina, 4406 - Novo Mundo - 81.050-000 - Curitiba - PR 41
Bairro: Novo Mundo **CEP:** 81.050-000
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3212-5871 **E-mail:** cepht@sesa.pr.gov.br

ANEXO 3 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA SECRETARIA MUNICIPAL DA SAÚDE DE CURITIBA

SECRETARIA MUNICIPAL DA
SAÚDE DE CURITIBA - SMS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da sensibilidade dentária em crianças portadoras de hipomineralização de molares e incisivos.

Pesquisador: Juliana Feltrin de Souza Caparroz

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 25047519.0.3001.0101

Instituição Proponente: Prefeitura Municipal de Curitiba

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 04/08/2022

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.598.414

Apresentação da Notificação:

Trata-se de relatório parcial da pesquisa denominada "Avaliação da sensibilidade dentária em crianças portadoras de hipomineralização de molares e incisivos", de responsabilidade da pesquisadora Juliana Feltrin de Souza Caparroz, CAAE: 25047519.0.3001.0101, instituição proponente UFPR, protocolo nº 115/2022, aprovado pelo CEP SMS em 18/05/2020. A hipomineralização de molares e incisivos (HMI) é caracterizada por opacidades de coloração branca, amarela ou marrom que podem estar associadas à perda de estrutura dentária ou restaurações atípicas. A HMI aumenta a necessidade de tratamento odontológico na infância e tem sido uma problemática para a clínica odontopediátrica, uma vez que, logo após a erupção dentária os primeiros molares permanentes afetados pela opacidade apresentam necessidade de tratamento pelo maior risco à carie dentária e pelo relato de hipersensibilidade. Serão avaliados escolares da rede pública municipal de ensino. O exame

Endereço: Rua Atílio Bório, 680

Bairro: Cristo Rei

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-4961

CEP: 80.050-250

E-mail: etica@sms.curitiba.pr.gov.br

Continuação do Parecer: 5.598.414

projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Relatório Final APROVADO conforme parecer do relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	relatorio_parcial.pdf	04/08/2022 14:28:27	Juliana Feltrin de Souza Caparroz	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 23 de Agosto de 2022

Assinado por:
antonio dercy silveira filho
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Atílio Bório, 680

Bairro: Cristo Rei

CEP: 80.050-250

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-4961

E-mail: etica@sms.curitiba.pr.gov.br

ANEXO 4 - CRITÉRIO CLÍNICO PARA CLASSIFICAÇÃO DOS DEFEITOS DE DESENVOLVIMENTO DO ESMALTE (DDE), SEGUNDO GHANIM ET AL., 2015.

Código	Tipo de DDE	Definição
0	Sem defeito visível de esmalte	Dente/superfície aparentemente livre de lesões no esmalte, como opacidades difusas, hipoplasia, hipomineralização demarcada e amelogenese imperfeita.
1	Defeito de esmalte, não relacionado a HMI/HSMD	Defeitos quantitativos ou qualitativos que não se enquadram nas características definidas para MIH ou HSPM. Inclui:
11	Opacidades difusas	Distribuição linear, em manchas ou manchas confluentes com bordas indistintas. Inclui opacidades causadas por fluorose.
12	Hipoplasia	Pode se apresentar como fosseta, sulco ou áreas de perda de esmalte com bordas arredondadas e lisas adjacentes ao esmalte íntegro.
13	Amelogenese imperfeita	Malformações do esmalte de origem genética, com variações na espessura, suavidade e dureza.
14	Defeito de hipomineralização (não HMI/HSMD)	Defeitos demarcados semelhantes a HMI/HSMD em dentes que não são índice HMI/HSMD.
2	Opacidades demarcadas (HMI/HSMD))	: Defeito delimitado com alteração na translucidez do esmalte, de branco/creme a amarelo/marrom. O esmalte tem espessura normal, superfície lisa e limite bem definido.
21	Opacidades brancas ou cremosas	Cor branca ou cremosa.
22	Opacidades amarelas ou marrons	Cor amarela ou marrom.
3	Fratura pós-eruptiva do esmalte	Perda do esmalte superficial após a erupção, parecendo que o esmalte não se formou. Associado à opacidade demarcada. Ocorre em superfícies de baixo risco de cárie.
4	Restaurações atípicas	Forma e tamanho não compatíveis com restaurações realizadas para tratamento de lesões de cárie comuns. Pode se estender a superfícies lisas e ter esmalte afetado visível. Em dentes anteriores, não está relacionada a trauma.
5	Cárie atípica	Lesão com tamanho e formato que não correspondem à distribuição usual. Pode ser associada à MIH/HSPM se houver outros sinais.
6	Extração atípica (ausência por HMI/HSMD)	Suspeita-se na ausência de FPM ou SPM em dentição saudável, com outros sinais em FPM/SPM. Improvável em incisivos permanentes.
7	Não pode ser avaliado	Dente com destruição extensa que impede a identificação da causa.

Tradução e adaptação da tabela extraída de: GHANIM, A.; ELFRINK, M.; WEERHEIJM, K.; MARIÑO, R. *et al.* A practical method for use in epidemiological studies on enamel hypomineralisation. *European Archives of Paediatric Dentistry* v. 16, n. 3, p. 235-246, 2015.

ANEXO 5 - CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DA IDADE DENTÁRIA PROPOSTO POR DERMIRJIAN ET AL. (1973)

Estágio	Descrição
A	O início de calcificação pode ser visualizado no nível superior da cripta, formando um cone invertido. Não há fusão desses pontos de calcificação.
B	A fusão dos pontos de calcificação forma uma ou várias cúspides que se unem delineando a superfície oclusal.
C	a. A formação do esmalte está completa na superfície oclusal. Sua extensão e convergência em direção a região cervical pode ser vista. b. O início da formação da dentina pode ser visto. c. O contorno da câmara pulpar se mostra curvo na borda oclusal.
D	a. A formação da coroa está completa até a junção amelo-cementária. b. A borda superior da câmara pulpar nos dentes uni-radiculares apresenta forma curva bem definida. A projeção dos cornos pulpares está presente em forma de “topo de sombrinha”. Nos molares, a câmara pulpar apresenta forma trapezoidal. c. O início da formação radicular é visto em forma de espícula.
E	Dentes uni-radiculares a. As paredes da câmara pulpar formam linhas retas cuja continuidade é interrompida pela presença do corno pulpar. b. O comprimento da raiz é menor do que a altura da coroa. Molares a. A formação inicial da bifurcação radicular pode ser vista na forma de um ponto de calcificação ou em forma semilunar. b. O comprimento das raízes é menor do que a altura da coroa.
F	Dentes uni-radiculares a. A Parede da câmara pulpar apresenta mais ou menos uma forma triangular. O ápice termina em forma de funil. b. O comprimento da raiz é igual ou maior que a altura da coroa. Molares a. A região calcificada da bifurcação mostra-se mais desenvolvida, dando as raízes um contorno mais definido terminando em forma de funil; b. O comprimento das raízes é igual ou maior a altura da coroa.
G	As paredes do canal radicular estão paralelas e o forame apical está parcialmente aberto.
H	a. O forame apical está completamente fechado. b. O espaço do ligamento periodontal apresenta largura uniforme ao redor da raiz e ápice radicular.

Tradução da tabela extraída de: DEMIRJIAN, Arto; GOLDSTEIN, Harvey; TANNER, James M. A new system of dental age assessment. Human biology, p. 211-227, 1973.