

VARIANTES GENÉTICAS EM *AXIN2* PREDIZEM O RISCO DE FISSURA LABIAL COM OU SEM FISSURA PALATINA NÃO-SINDRÔMICA, MAS NÃO O DE AGENESIA DENTÁRIA

Palavras-Chaves: *AXIN2*, FL±PNS, AGENESIA DENTÁRIA

Autores:

SARA GARCIA AZEVEDO, FOP - UNICAMP

Prof.^(a). Dr.^(a). RENATO ASSIS MACHADO (co-orientador), FOP - UNICAMP

Prof.^(a). Dr.^(a). RICARDO DELLA COLETTA (orientador), FOP - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As fissuras labiais com ou sem fissuras palatinas não-sindrômicas (FL±PNS) estão associadas a uma maior prevalência de agenesias dentárias. Há evidências de que existem genes e vias de sinalização celular comuns ao desenvolvimento dentário e à FL±PNS e que variantes genéticas nestes genes podem regular a ocorrência destas alterações congênitas (Paranaíba et al., 2013; Phan et al., 2016; Sá et al., 2016a,b; das Neves et al., 2022; da Cas et al., 2020). Dentre os genes associados a essas duas condições está o *AXIN2* (Letra et al., 2012; Yu et al., 2019). Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar associações entre os marcadores polimórficos rs7591, rs7210356, rs4791171, rs11079571, rs3923087 e rs2240308 em *AXIN2* e o risco de FL±PNS e agenesia dentária na população brasileira.

METODOLOGIA:

Este estudo está inserido em um projeto multicêntrico e conta com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas e de todos os Comitês de Ética dos centros coparticipantes (Plataforma Brasil, CAAE 08452819.0.0000.5418).

O estudo analisou 312 amostras, divididas em 4 grupos: 97 pertencentes ao grupo de pacientes com FL±PNS e agenesia dentária fora da área da fissura (Grupo 1), 119 pertencentes ao grupo de pacientes com FL±PNS sem agenesia dentária (Grupo 2), 84 amostras controles sem fissura orofacial e agenesia dentária (Grupo 3) e 12 amostras de pacientes com agenesia dentária apenas (Grupo 4).

As amostras de DNA foram isoladas de células bucais coletadas por meio de um bochecho com uma solução de 3% sacarose, com um protocolo previamente descrito (Machado et al., 2022). A ancestralidade genômica de cada indivíduo foi determinada pela genotipagem de um conjunto de 40 polimorfismos de inserção/deleção bialélicos (indels) previamente validados como marcadores informativos para ancestralidade brasileira (Bastos-Rodrigues et al., 2006).

As reações de genotipagem das variantes em *AXIN2* foram realizadas utilizando o sistema de discriminação alélica com sondas fluorescentes. Os polimorfismos apresentam primers e sondas como ensaio por demanda (sistema TaqMan® da Applied Biosystems, USA). As reações foram realizadas no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, USA) em uma reação de 5 µl contendo 2,50 µl de 2x Genotyping Master Mix, 0,12 µl da mistura de primers e sondas e 2,38 ng DNA, os quais foram diluídos em 2,26 µl de água livre de DNase e RNase. Os parâmetros de amplificação foram: 1 ciclo de 10 min a 95°C (desnaturação inicial) e 40 ciclos de 15 s a 92°C e 1 min a 60°C (estágio de amplificação), os quais foram seguidos por 1 ciclo de 30 s a 60°C.

O teste do qui-quadrado foi empregado para avaliar as diferenças na distribuição por sexo entre os grupos, enquanto que o teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as proporções de ancestralidade genômica entre os grupos. A existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada no grupo controle. Os modelos de regressão logística múltipla sob modelos genéticos aditivos, dominantes e recessivos, considerando o sexo e a ancestralidade genômica como potenciais covariáveis, foram realizados com os pacotes SNPassoc e Haplo.stats no software RStudio. O valor de $p < 0,05$ foi adotado como indicativo de diferença estatisticamente significativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A Tabela 1 apresenta as características dos grupos analisados. Houve um predomínio do sexo feminino entre os indivíduos dos grupos controle (sem fissura orofacial e sem agenesia dentária) e agenesia dentária isolada, atingindo valores estatisticamente significantes. Em termos de proporções de ancestralidade, os grupos foram similares, com a ascendência europeia sendo a mais comum, seguida pela ascendência africana e ameríndia. Infelizmente, a ancestralidade dos pacientes com agenesia dentária isolada não foi concluída.

Tabela 1. Distribuição dos pacientes dos diferentes grupos incluídos neste estudo em relação ao sexo e a ancestralidade genômica.

	FL±PNS com agenesia dentária (n=97)	FL±PNS sem agenesia dentária (n=119)	Controle sem agenesia dentária (n=84)	Pacientes com agenesia dentária apenas (n=12)
Sexo				
Masculino	52 (53,6%)	64 (53,8%)	31 (36,9%)	2 (16,7%)
Feminino	45 (46,4%)	55 (46,2%)	53 (63,1%)*	10 (83,3%)*
Ancestralidade				
Europeia	83,60%	87,60%	81,20%	-
Africana	11,60%	6,50%	14,80%	-
Ameríndia	4,80%	5,90%	4,00%	-

* $p < 0,05$

A taxa de sucesso da genotipagem (*call rate*) foi no mínimo de 99,3%. Todas as frequências genotípicas dos SNPs no grupo controle estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando não haver desvios significativos da distribuição genética esperada. Apenas dois SNPs (rs11079571 e rs4791171) apresentaram resultados significativos, que estão resumidos na Tabela 2.

Em rs11079571, o genótipo GA foi associado a um risco aumentado de FL±PNS com agenesia dentária e FL±PNS sem agenesia dentária. Assim, é provável que esse SNP tenha influência somente no risco de FL±PNS, não impactando na formação dentária. Na população brasileira, esse SNP já foi associado com um maior risco ao desenvolvimento de FL±PNS (Machado et al., 2017). Porém, não há estudos que o analisou simultaneamente as fissuras orofaciais e as agenesias dentárias.

A presença do alelo G em rs4791171 foi associada como um fator de proteção ao desenvolvimento de FL±PNS e agenesia dentária, isoladamente, e quando presentes no mesmo paciente. Contudo, diferenças genotípicas foram encontradas apenas nos grupos de FL±PNS com agenesia dentária e FL±PNS sem agenesia dentária. No estudo de Machado et al. (2017), esse mesmo SNP foi associado à ocorrência de FL±PNS, resultados que contrastam com os nossos. Na literatura, não há outros estudos que avaliem a relação desse SNP com FL±PNS e/ou agenesia dentária.

Tabela 2. Associações de SNPs em AXIN2 com risco de fissura labial com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FL±PNS) sem e com agenesia dentária fora da área de fissura e pacientes sem FL±PNS com e sem agenesia dentária. Os valores de P foram ajustados para covariáveis por regressão logística.

	Controle sem agenesia (%)	FL±PNS com agenesia (%)	OR (95% IC)/valor de p	FL±PNS sem agenesia (%)	OR (95% IC)/valor de p	Pacientes com agenesia apenas (%)	OR (95% IC)/valor de p
rs4791171							
Alelo							
A	31,1	62,1	Referência	67	Referência	72,7	Referência
G	68,9	37,9	(0,17-0,42)/ 0,0001	33	(0,14-0,34)/ 0,0001	27,3	(0,06-0,45)/ 0,0001
Genótipo							
AA	11	44,2	Referência	46,6	Referência	9,1	Referência
AG	40,2	35,8	(0,07-0,66)/ 0,004	40,7	(0,07-0,63)/ 0,0003	36,4	(0,13-2,12)/0,94
GG	48,8	20	(0,03-0,38)/ 0,0002	12,7	(0,04-0,39)/ 0,00002	54,5	(0,14-12,64)/0,78
Dominante (AA+AG+GG)	11,0/89,0	44,2/55,8	(0,06-0,34)/ 0,0004	46,6/53,4	(0,06-0,49)/ 0,0001	9,1/90,9	(0,08-7,45)/0,82
Recessivo (AA+AG/GG)	51,2/48,8	80,0/20,0	(0,13-0,51)/0,02	87,3/12,7	(0,15-0,78)/ 0,01	45,5/54,5	(0,14-1,99)/0,34
rs11079571							
Alelo							
G	62,1	52,4	Referência	53,2	Referência	63,6	Referência

A	37,9	47,6	1,48 (0,96-2,29)/0,07	46,8	1,44 (0,95-2,17)/0,08	36,4	0,93 (0,37-2,35)/0,88
Genótipo							
GG	27,7	6	Referência	6,3	Referência	27,3	Referência
GA	68,7	92,9	7,31 (1,53-34,90)/0,003	93,7	4,41 (1,61-12,08)/0,002	72,7	1,08 (0,25-4,74)/0,91
AA	3,6	1,2	0,32 (0,03-3.15)/0,20	0	-	0	-
Dominante (GG/GA+AA)	27,7/72,3	6,0/94,0	6,06 (2,18-16,86)/0,000 9	6,3/93,7	4,41 (1,61-12,08)/0,002	27,3/72,7	1,08 (0,25-4,74)/0,91
Recessivo (GG+GA/AA)	96,4/3,6	98,8/1,2	0,32 (0,03-3.15)/0,20	100,0/0,0	-	100,0/0,0	-

CONCLUSÕES:

Nossos resultados apontam que não há participação dos SNPs rs7591, rs7210356, rs4791171, rs11079571, rs3923087 e rs2240308 no desenvolvimento simultâneo de FL±PNS e agenesia dentária na população brasileira. Todavia, estudos com uma população maior, principalmente de pacientes com agenesia dentária apenas, bem como a análise de interação genética com outros marcadores na mesma via de sinalização, são necessários para que a relação entre essas condições seja melhor compreendida.

BIBLIOGRAFIA:

Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet.* 2006; 70: 658-65. doi: 10.1111/j.1469-1809.2006.00287.x

da Cas NV, Machado RA, Coletta RD, Carrinho Ayroza Rangel AL. Patterns of dental anomalies in patients with nonsyndromic oral cleft. *Braz. J. Oral Sci.* [Internet]. 2020 Aug. 27 [cited 2022 Oct. 25];19:e208729. Available from: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/bjos/article/view/8658729>

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

Letra A, Bjork B, Cooper ME, Szabo-Rogers H, Deleyiannis FW, Field LL, Czeizel AE, Ma L, Garlet GP, Poletta FA, Mereb JC, Lopez-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM, Wendell S, Blanton SH, Liu K, Hecht JT, Marazita ML, Vieira AR, Silva RM. Association of AXIN2 with non-syndromic oral clefts in multiple populations. *J Dent Res.* 2012 May;91(5):473-8. doi: 10.1177/0022034512440578. Epub 2012 Feb 27. PMID: 22370446; PMCID: PMC3327729.

Machado RA, de Freitas EM, de Aquino SN, Martelli DR, Swerts MS, Reis SR, Persuhn DC, Moreira HS, Dias VO, Coletta RD, Martelli-Júnior H. Clinical relevance of breast and gastric cancer-associated polymorphisms as potential susceptibility markers for oral clefts in the Brazilian population. *BMC Med Genet.* 2017 Apr 4;18(1):39. doi: 10.1186/s12881-017-0390-y. PMID: 28376813; PMCID: PMC5379638.

Machado RA, Ayroza Rangel ALC, de Almeida Reis SR, Scariot R, Coletta RD, Martelli-Júnior H. Evaluation of genome-wide association signals for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a multiethnic Brazilian population. *Arch Oral Biol.* 2022 Mar;135:105372. doi: 10.1016/j.archoralbio.2022.105372. Epub 2022 Feb 8. PMID: 35151029.

Paranaíba LM, Coletta RD, Swerts MS, Quintino RP, de Barros LM, Martelli-Junior H. Prevalence of Dental Anomalies in Patients With Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate in a Brazilian Population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2013; 50(4): 400-5.

Phan M, Conte F, Khandelwal KD, Ockeloen CW, Bartzela T, Kleefstra T, van Bokhoven H, Rubini M, Zhou H, Carels CE. Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arms? *Hum Genet.* 2016;135(12):1299-1327. doi: 10.1007/s00439-016-1733-z. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27699475; PMCID: PMC5065589.

Sá J, Araújo L, Guimarães L, Maranhão S, Lopes G, Medrado A, Coletta R, Reis S. Dental anomalies inside the cleft region in individuals with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal.* 2016a;21(1):e48-52. doi: 10.4317/medoral.20757.

Sá J, Mariano LC, Canguçu D, Coutinho TS, Hoshi R, Medrado AP, Martelli-Junior H, Coletta R, Reis SR. Dental anomalies in a brazilian cleft population. *The Cleft Palate-craniofacial Journal: Official Publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association.* 2016b;53(6):714-719. doi: 10.1597/14-303.

Yu M, Wong SW, Han D, Cai T. Genetic analysis: Wnt and other pathways in nonsyndromic tooth agenesis. *Oral Dis.* 2019 Apr;25(3):646-651. doi: 10.1111/odi.12931. Epub 2018 Jul 23. PMID: 29969831; PMCID: PMC6318069.