



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**GENÉTICA DO PROGNATISMO MANDIBULAR:  
AVALIAÇÃO DE HEREDOGRAMAS, ANÁLISE COMPLEXA DE  
SEGREGAÇÃO E ANÁLISE DE LIGAÇÃO COM *LOCI* CANDIDATOS  
EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS AVERIGUADAS A PARTIR DE  
PROBANDOS AFETADOS**

**RICARDO MACHADO CRUZ**

**Brasília**

**2006**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Genética do prognatismo mandibular: avaliação de  
heredogramas, análise complexa de segregação e análise de  
ligação com *loci* candidatos em famílias brasileiras  
averiguadas a partir de probandos afetados**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

**Ricardo Machado Cruz**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silviene Fabiana de Oliveira**

Brasília

2006



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

TESE DE DOUTORADO

**Ricardo Machado Cruz**

Título

**“Genética do prognatismo mandibular: avaliação de heredogramas, análise complexa de segregação e análise de ligação com *loci* candidatos em famílias brasileiras averiguadas a partir de probandos afetados”**

Brasília, 25 de Agosto de 2006

Dedico este trabalho

À minha esposa, **Carla**, pelo total apoio, paciência, dedicação, parceria e amor dedicados incondicionalmente a mim e aos nossos filhos, principalmente durante todos esses anos em que este trabalho me privou de vários momentos de convivência familiar.

Aos meus filhos, **Priscila e Guilherme**, razão principal de toda nossa luta e dedicação, por todos os momentos de felicidade que têm nos proporcionado desde que foram concebidos e que, com certeza, ainda nos proporcionarão por toda a vida.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A **Deus**, pelo seu amor incondicional, por ser a origem e o fim de tudo, e por estar sempre pronto para nos ouvir e acolher.

Aos meus pais, **Pompílio e Leila**, pelos exemplos de amor, dedicação, perseverança, justiça e lealdade, que têm nos ajudado a trilhar nossos caminhos e que agora estamos passando aos seus netos.

## OUTROS AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com a participação direta ou indireta de várias pessoas e instituições listadas abaixo, às quais agradeço imensamente pela contribuição.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silviene Fabiana de Oliveira**, pela amizade e orientação precisa, por ter aceitado participar desta longa jornada, mesmo se tratando de uma nova área de pesquisa no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, e sobretudo por ter cumprido esse desafio com competência e dedicação.

Ao **Prof. Dr. James Mah**, da *University of Southern Califórnia*, Los Angeles, USA, pela orientação inicial para o desenho do estudo, da coleta da amostra e para a elaboração dos heredogramas.

Aos **Prof. Dr. James Hartsfield** e **Prof. Dr. Daniel Koller**, da *University of Indiana*, Indianapolis, USA, pelo fornecimento dos iniciadores para os marcadores microssatélites utilizados nesta pesquisa, pela cooperação na avaliação dos resultados da genotipagem e da análise de ligação.

Ao **Prof. Dr. Henrique Krieger** e ao Doutorando **Ricardo de Godói Mattos Ferreira**, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências biomédicas da Universidade de São Paulo, pela cooperação na avaliação dos heredogramas e na realização da análise de segregação.

Ao **Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira**, do Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, pelo auxílio nas diversas etapas laboratoriais para a genotipagem dos marcadores moleculares e análise de resultados.

À **Universidade Católica de Brasília**, pela parceria firmada, que nos permitiu utilizar os laboratórios, seqüenciadores de DNA e computadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, Profa. Dra. Iris Ferrari, Prof. Dr. Orlando Ayrton de Toledo, Prof. Dr. César Koppe Grisólia e Profa. Dra. Maria Nazaré Klautau Guimarães**, por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho, e pela significativa contribuição para seu aprimoramento.

Aos **colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília**, especialmente a aluna **Luciana Rollemberg Nogueira**, pela ajuda na execução das reações de amplificação de DNA, e os funcionários **André Luiz Cardoso Ramos e William Baião Reis**, do Laboratório de Genotipagem, pela ajuda na operação dos seqüenciadores automáticos de DNA.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo**, do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, pela disponibilidade e colaboração.

Aos **colegas ortodontistas e cirurgiões buco-maxilo-faciais** de Brasília que ajudaram na coleta da amostra, indicando pacientes portadores de prognatismo mandibular, que poderiam ser usados como probandos neste estudo.

Aos **probandos e familiares** pela inestimável ajuda ao se disporem a doar material biológico e a serem submetidos a vários exames clínicos e radiográficos, para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos **Professores e colegas do Laboratório de Genética e do programa de Pós-graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da UnB**, pelos momentos agradáveis, pela amizade e coleguismo nesses últimos anos e pelas orientações e sugestões nas mais diversas fases de elaboração deste trabalho.

Ao **Laboratório Pasteur de análises clínicas**, pela coleta do sangue dos indivíduos da amostra.

À **Clínica Radiosul de Radiologia Odontológica**, pela elaboração das documentações ortodônticas de vários indivíduos da amostra.

Ao **Tribunal de Justiça do Distrito Federal e Territórios e ao Curso de Odontologia da Universidade Paulista – Campus Brasília**, que

permitiram que a minha carga horária pudesse ser reduzida em alguns períodos, para que pudesse me dedicar à elaboração deste trabalho.



# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XII</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>I - INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
HISTÓRICO	2
VARIAÇÃO GENÉTICA	4
O PROCESSO PARA IDENTIFICAÇÃO DO PADRÃO DE HERANÇA	5
BUSCA DE GENES ASSOCIADOS À ETIOLOGIA DE CARACTERÍSTICAS COMPLEXAS	7
<b>II - ANÁLISE GENÉTICA DOS PROBLEMAS CRANIOFACIAIS</b>	<b>10</b>
CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL: INFLUÊNCIA GÊNICA	10
PROGNATISMO MANDIBULAR	11
O PAPEL DA GENÉTICA NA OCORRÊNCIA DO PROGNATISMO MANDIBULAR	15
<b>CAPÍTULO 1 - AVALIAÇÃO DE HEREDOGRAMAS E ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO DO PROGNATISMO MANDIBULAR EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS</b>	<b>18</b>
<b>I INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
AVALIAÇÃO DE HEREDOGRAMAS E ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO	20
<b>II PROPOSIÇÃO</b>	<b>24</b>
<b>III MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
AMOSTRAGEM	25
AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO	29
OBTENÇÃO DOS HEREDOGRAMAS	32
AVALIAÇÃO DOS HEREDOGRAMAS	32
ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
ANÁLISE COMPLEXA DE SEGREGAÇÃO	33
<b>IV-RESULTADOS</b>	<b>37</b>
AVALIAÇÃO DOS HEREDOGRAMAS	37
ANÁLISE COMPLEXA DE SEGREGAÇÃO	45
<b>V – DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
AVALIAÇÃO DOS HEREDOGRAMAS	48
ANÁLISE COMPLEXA DE SEGREGAÇÃO	57
<b>VI – CONCLUSÃO</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO 2 - ANÁLISE DE LIGAÇÃO DE SEIS LOCI MICROSSATÉLITES SITUADOS PRÓXIMOS A GENES CANDIDATOS AO PROGNATISMO MANDIBULAR EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS</b>	<b>61</b>
<b>I - INTRODUÇÃO</b>	<b>62</b>

LIGAÇÃO GÊNICA	62
<i>LOD SCORES</i>	65
ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO DE LOCI RELACIONADOS A CARACTERÍSTICAS COMPLEXAS	67
ABORDAGEM PARA ANÁLISE DE LIGAÇÃO UTILIZANDO MARCADORES PRÓXIMOS A REGIÕES CANDIDATAS AO PROGNATISMO MANDIBULAR	72
<b>II PROPOSIÇÃO</b>	<b>74</b>
<b>III MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>75</b>
AMOSTRAGEM	75
EXTRAÇÃO DE DNA	76
MARCADORES GENÉTICOS UTILIZADOS	77
REAÇÕES DE PCR ( <i>POLYMERASE CHAIN REACTIONS</i> )	80
VERIFICAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO	80
GENOTIPAGEM	80
ANÁLISE DE LIGAÇÃO	81
<b>IV RESULTADOS</b>	<b>83</b>
<b>V DISCUSSÃO</b>	<b>86</b>
<b>VI CONCLUSÃO</b>	<b>93</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>94</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO 1 -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO 2 - HEREDOGRAMAS DAS 55 FAMÍLIAS</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO 3 – PROTOCOLOS DE LABORATÓRIO</b>	<b>134</b>
<b>ANEXO 4 - DADOS DA ANÁLISE DE LIGAÇÃO POR MARCADOR POR FAMÍLIA</b>	<b>138</b>

**Resumo**

O prognatismo mandibular apresenta uma tendência familiar. Vários modelos genéticos têm sido propostos, sendo que a maioria sugere uma herança poligênica e multifatorial com um limiar de expressão. O propósito deste trabalho foi examinar modelos genéticos de sua transmissão em famílias brasileiras e procurar evidências de ligação de seu *locus* com seis marcadores do tipo microssatélite (D1S234, D4S3038, D6S1689, D7S503, D10S1483 e D19S566), localizados próximos a regiões candidatas. A amostra compreendeu 2606 indivíduos de 55 famílias brasileiras coletadas a partir de um probando afetado. A história familiar foi averiguada e o *status* fenotípico dos probandos e familiares foi avaliado pela anamnese, análises cefalométricas, fotos e modelos ortodônticos. Os heredogramas foram desenhados (programa PELICAN) e analisados visualmente. Foi observada uma maior prevalência da desordem no sexo feminino quando os probandos foram incluídos no cálculo. A maioria dos heredogramas sugere um padrão de herança autossômica dominante, com penetrância incompleta. A herdabilidade foi estimada em 31,6%. Para a análise complexa de segregação, utilizando o programa POINTER, partes dos heredogramas foram excluídas para obter um só fundador (N final = 2050). A análise indicou a presença de um gene principal com sinais claros de herança mendeliana e presença de um componente multifatorial. Para a análise paramétrica de ligação, o DNA de 42 indivíduos afetados pertencentes a 10 das 55 famílias da amostra inicial, foi analisado para os seis microssatélites. Os parâmetros foram ajustados para um padrão de herança autossômico dominante, com penetrância incompleta fixada em 90% e uma frequência alélica de 1% para o gene principal. O potencial de ligação dos heredogramas foi testado pelo programa SIMLINK. A análise de dois pontos, utilizando o programa MLINK, avaliou os *Lod Scores* sobre um conjunto de valores de  $\theta$ . Os resultados indicaram não haver evidências de ligação para os seis microssatélites em um  $\theta = \text{zero}$ . Para todos os marcadores, uma região de exclusão foi delimitada em ambas as direções a partir do locus do marcador, exceto para o D4S3038, para o qual não foi possível concluir ou excluir a ligação. Sugere-se que possa haver heterogeneidade de *locus* para o prognatismo mandibular.

**Palavras-chave:** prognatismo mandibular, famílias brasileiras, segregação, ligação, microssatélites.

## **Abstract**

There is a familial tendency to mandibular prognathism. Various genetic models have been described. It is assumed to be a polygenic trait in the vast majority of cases, with a threshold for expression. The purpose of the current study was to examine specific genetic models of the familial transmission of MP in Brazilian families and to search for evidences of linkage of six different microsatellite markers (D1S234, D4S3038, D6S1689, D7S503, D10S1483 and D19S566) located close to candidate regions. Study sample comprised 2606 individuals distributed in 55 families. Complete family histories for each proband were ascertained and the affection status of relatives were confirmed by lateral cephalograms, photographs and dental models. All the pedigrees were draw using PELICAN. Analysis showed major prevalence of MP in females when probands were included. The majority of the pedigrees suggest autosomal dominant inheritance. Incomplete penetrance was demonstrated by the observation of the proportion of unaffected parents and siblings of probands. Heritability of MP was estimated in 31.6%. Complex segregation analysis was performed using POINTER. Parts of some pedigrees were excluded to create 1-founder pedigrees, so final N was 2050. Segregation analysis indicated that there is a major gene that influences the outcome of mandibular prognathism with clear signs of Mendelian inheritance and a multifactorial component. For parametric linkage analysis, DNA was extracted from blood samples of 42 affected subjects, in 10 out of the original 55 families, amplified and genotyped with the GENOTYPER software (Perkin Elmer). Parameters were fixed for a dominant pattern of inheritance, with incomplete penetrance (90%) and 1% major gene allele frequency. The power of these pedigrees was estimated using SIMLINK. Two point LOD scores were calculated under a set of different values for  $\theta$ , using the program MLINK. The data from all the families indicates that there is no evidence for linkage of any of the six microsatellite markers to a MP *locus* at  $\theta = \text{zero}$ . For all the markers an exclusion region was delimited either direction, except for D4S3038 in which linkage couldn't be concluded nor excluded. The final results suggest that there should be locus heterogeneity for MP.

**Key Words:** Mandibular prognathism, Brazilian families, segregation analysis, linkage, microsatellites.



## *INTRODUÇÃO GERAL*

## **I - Introdução**

### **Histórico**

Desde os mais remotos tempos o homem busca resposta para duas perguntas centrais: quem somos e de onde viemos. O Projeto Genoma Humano e projetos derivados do mesmo buscam, em última instância, responder, ao menos parcialmente, essas questões. Esses projetos buscam um melhor conhecimento sobre como é e como funciona o organismo humano. Dessa forma, esses projetos têm levado ao desenvolvimento de tecnologias e conhecimentos que têm fornecido novos recursos para o estudo das regiões genômicas relacionadas a desordens e doenças.

Apesar do seqüenciamento do genoma humano (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001), o processo de entendimento do mesmo está apenas iniciando. Cabe agora identificar os genes envolvidos em condições específicas, sua variação na população e como eles interagem entre eles e com outros fatores. A identificação e o conhecimento do funcionamento dos genes responsáveis pelas características comuns e doenças hereditárias continuam a ser uns dos maiores objetivos da genética (Botstein e Rich, 2003).

Mesmo considerando o tamanho do genoma humano, espera-se que quase todas as doenças monogênicas, isto é, aquelas em que a expressão depende quase que exclusivamente de um único gene, que ainda não foram identificadas o sejam em breve. Um grande desafio é o estudo dos chamados fenótipos complexos – aqueles cuja manifestação seja decorrente da ação de múltiplos *loci* que exercem pequenos, mas significativos, efeitos no fenótipo e que sejam multifatoriais, isto é, que requeiram uma interação ambiental (O'Brien *et al.*, 2000).

Avanços tecnológicos têm tido uma influência considerável na compreensão desses processos complexos. Por exemplo, a descrição de marcadores genéticos ao longo do genoma humano, o desenvolvimento de métodos estatísticos para analisar a co-segregação de marcadores e doenças e as inovações na clonagem e sequenciamento do DNA têm tornado possível relacionar um determinado segmento de DNA com um determinado fenótipo herdado (Teare e Barret, 2005; Thomas, 2004; Botstein e Risch, 2003; Rao e Province, 2001; O'Brien *et al.*, 2000; Mossey, 1999<sup>a</sup>, Vastardis, 2000).

Até 1980, nenhum método para relacionar as doenças mendelianas com as seqüências genômicas responsáveis pelo fenótipo estava disponível. Naquela ocasião, foi proposta pela primeira vez a construção de um mapa de ligação genética em humanos utilizando polimorfismos de DNA anônimo no genoma total (RFLP). O princípio básico foi desenvolver, através de técnicas de DNA recombinante, sondas de DNA capazes de detectar seqüências de polimorfismos, ao serem hibridizadas com DNA genômico de um indivíduo digerido por enzimas de restrição. Cada uma das sondas definia um *locus*, e esses *loci* poderiam ser expandidos ou contraídos para incluir mais ou menos polimorfismos. Desta maneira, os *loci* idealmente polimórficos poderiam ser testados em heredogramas humanos, onde uma determinada característica herdada estaria segregando, para buscar evidências de ligação sem que para isso fosse necessário acesso direto ao gene responsável pela expressão daquela característica. Os autores sugeriram que para as doenças genéticas mapeadas desta maneira, os *loci* dos marcadores ligados poderiam ser usados como recurso preventivo em aconselhamentos genéticos (Botstein *et al.*, 1980). Desta forma, o mapa e os métodos e algoritmos desenvolvidos para sua construção proveram, pela primeira vez, uma ferramenta importante para tentar conectar fenótipos e DNA (Botstein e Risch, 2003).

Ao longo dos anos 80, centenas de RFLPs foram identificados e combinados em mapas de ligação no genoma total. Várias doenças importantes foram mapeadas, incluindo distrofia muscular de Duchenne, doença de Huntington e fibrose cística (Gusella, 1986). Entretanto, os RFLPs são pouco informativos pois são bialélicos em sua grande maioria. Além disso, os métodos requeridos para análise de RFLPs eram relativamente complicados e ineficientes, pois envolviam a digestão de DNA genômico com uma ou mais enzimas de restrição, separação dos fragmentos de DNA resultantes por tamanho com a utilização de eletroforese em gel de agarose, *Southern blotting* dos fragmentos de DNA em membranas e detecção dos fragmentos específicos pela hibridização nas membranas com sondas de DNA radioativas (Weber e Broman, 2001).

Em 1985, foi descrito um novo tipo de polimorfismo de DNA, multialélico e mais abundante: os STRs ou microssatélites (Jeffreys *et al.*, 1985). Como eram mais informativos e fáceis de serem genotipados, logo suplantaram os RFLPs (Weber e May, 1989). Até 2001, mais de 10.000 STRs já haviam sido identificados, mapeados e utilizados em análises de ligação para o mapeamento de centenas de genes causadores de doenças (Weber e Broman, 2001).



Entretanto, pesquisas em genética utilizando o ser humano costumam ser mais complexas que com outros organismos. Dentre outros fatores, é digna de nota a impossibilidade de realização de intervenções experimentais, tais como cruzamentos direcionados, mutagênese, seleções e modificações do material genético, além de que, em alguns casos, os fenótipos de interesse podem ser muito sutis (Botstein e Rich, 2003). Apesar disso, progressos na área têm permitido estimar que alterações herdadas em nossos genes sejam responsáveis por cerca de 3.000 a 4.000 desordens (Mah, 2001). Dentre essas, além das já citadas acima, estão doenças como anemia falciforme e neurofibromatose, de interesse médico, e outras doenças ou malformações, como Treacher-Collins, microsomia hemifacial, disostose cleidocranial, prognatismo mandibular e diversas formas de anodontia, que também interessam ao profissional de odontologia (Walker e Trainor, 2006; Kelberman *et al.*, 2001; Simpson, 1991).

Também tem sido demonstrado que a genética está envolvida na suscetibilidade de um indivíduo desenvolver doenças mais comuns como câncer, doenças cardíacas e diabetes (Antonioni *et al.*, 2006; Roberts e Stewart, 2006; Kantarova e Buc, 2006). Da mesma forma, fatores genéticos podem estar envolvidos na suscetibilidade a doenças que já foram consideradas estritamente fundamentadas em alterações ambientais, tais como tuberculose, malária, doença periodontal e cárie (Fiesch, 2006; Bonneaud, 2006; Laine *et al.*, 2005; Nariyama *et al.*, 2004)

A identificação de pessoas que tenham uma maior probabilidade de desenvolver uma doença está se tornando cada vez mais acessível, em especial com o desenvolvimento dos denominados testes de DNA específicos para determinadas características. Com isso, estratégias de prevenção individualizada, detecção precoce e tratamento ou redução dos efeitos de doenças ou malformações genéticas vêm sendo buscadas.

### **Variação genética**

A variação genética no homem, a exemplo de outros organismos, pode ser classificada em duas categorias básicas. Para determinadas características específicas, as diferenças são qualitativas, como, por exemplo, para o sistema ABO de antígenos eritrocitários, onde os genótipos individuais são mais facilmente identificados. Nesses casos, as frequências gênicas podem ser estimadas e uma análise do tipo mendeliana pode ser empregada. Já quanto às características contínuas, como altura, peso,

crescimento facial e tamanho de dentes, as diferenças entre os indivíduos são quantitativas. Como estas são produtos da ação de alelos de inúmeros *loci* gênicos e são modificadas por interações ambientais, o estudo dessas características em humanos requer análises mais específicas e maior atenção na interpretação dos resultados.

Se a variação genética para um dado fenótipo é dependente da segregação simultânea de muitos genes (poligenes) e é afetada pelo ambiente, considera-se que a herança seja do tipo poligênica multifatorial. Nesse tipo de herança, os genes estão sujeitos às mesmas leis de transmissão genética e têm as mesmas propriedades gerais dos genes únicos envolvidos nas características qualitativas.

Os diferentes tipos de produtos gênicos podem ser considerados como estando em diferentes níveis a partir de um nível fundamental de atividade gênica. As enzimas, por exemplo, podem ser produtos diretos da ação gênica. Em muitos casos, um único *locus* é responsável pela seqüência primária, isto é, a seqüência de aminoácidos de uma dada enzima, o que define a estrutura e, conseqüentemente, a atividade da mesma. Substituições de nucleotídeos na seqüência gênica levam ao surgimento dos alelos, o que pode levar à variabilidade na seqüência de aminoácidos na enzima e a alterações na função da mesma.

As características morfológicas, por outro lado, tais como as inúmeras medidas utilizadas para descrever a forma da face, da mandíbula e da maxila, não estão situadas nos níveis genéticos fundamentais, pois são resultados de uma vasta rede de processos interativos, hierárquicos, bioquímicos e de desenvolvimento. Cada gene é capaz de influenciar muitas características morfológicas, isto é, pleiotrópico. Dessa forma, uma mutação deletéria, apesar de produzir um único efeito ao nível molecular, pode resultar em uma síndrome repleta de anomalias morfológicas. A hierarquia inversa também é válida, isto é, as características morfológicas geralmente dependem de muitos genes diferentes (Mossey, 1999<sup>a</sup>; Singh, 1999).

### **O processo para identificação do padrão de herança**

O processo para a definição da base genética de um determinado fenótipo deve seguir uma progressão lógica. O primeiro passo é a epidemiologia descritiva, onde as variações quanto à origem/ascendência geográfica (denominada comumente como grupo étnico e/ou raça), classe social, idade e sexo podem fornecer pistas do envolvimento de fatores genéticos e/ou ambientais.

O próximo passo na busca de uma possível etiologia genética é investigar se um dado fenótipo apresenta agregação familiar. Neste caso, é observada maior ocorrência de manifestação da característica em certas famílias do que seria esperado se fosse devido ao acaso. É relevante também examinar se aquela tendência familiar pode ser modificada pelo grau de relacionamento genético, idade ou por fatores ambientais (Thomas, 2004). Isso é feito baseado em comparações caso-controle de histórias familiares ou em estudos com gêmeos ou crianças adotadas (Burton *et al.*, 2005).

A ocorrência de um fenótipo de herança complexa resulta de uma combinação de fatores genéticos e ambientais, em parte previsíveis e em parte devido ao acaso. Conseqüentemente, deve-se inicialmente distinguir entre as agregações familiares inteiramente acidentais daquelas onde haja uma sistemática tendência para que um determinado fenótipo segregue através das gerações daquela família, o que envolve um componente genético. Quando há um componente genético, há inúmeros casos em que o padrão de herança não segue os modelos simples.

A análise de segregação auxilia na determinação da presença de um ou mais genes principais dentro das famílias que podem explicar toda ou parte da agregação familiar da característica de interesse observada (Burton *et al.*, 2005). Estudos familiares baseados em uma série de casos em uma determinada população são geralmente usados para esse propósito. Com isso, é possível estabelecer se o padrão de herança do fenótipo entre os familiares é compatível com um ou mais genes principais ou simplesmente pelo compartilhamento dos mesmos fatores ambientais.

A observação de que uma característica esteja apresentando agregação familiar não estabelece necessariamente que exista um componente genético na sua manifestação (Thomas, 2004). É bom lembrar que os membros de uma mesma família compartilham também muitas condições ambientais que, de alguma maneira, podem estar relacionadas à etiologia da doença estudada. Por outro lado, nem todos os membros de uma dada família estão relacionados geneticamente, como por exemplo, os cônjuges. Além disso, fatores ambientais discretos, por exemplo, podem também estar sendo transmitidos através das famílias de uma maneira que mimetiza a ação de um gene (fenocópias).

Entretanto, somente um *locus* gênico é capaz de seguir as leis de herança mendeliana (as probabilidades de transmissão) e a busca pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. As relações genéticas são definidas pela probabilidade de dois membros de um heredograma compartilhar um ou mais alelos para qualquer *locus* autossômico, que

tenham a mesma origem. Por outro lado, é importante também salientar que a contribuição não genética para a agregação familiar, um ponto muitas vezes negligenciado, deveria ser mais comumente investigado (Burton *et al.*, 2005).

Os termos familiar e hereditário são muitas vezes confundidos e usados de maneira equivocada. Em epidemiologia genética usa-se o termo “esporádico” para se referir aos casos isolados sem uma história familiar da doença e “familiar” para se referir aos casos com uma história familiar positiva. Porém, mesmo entre os casos com uma história familiar onde a recorrência de uma dada característica é maior do que a observada na população não é possível afirmar sem maiores informações que a característica é hereditária. Desta maneira, o termo hereditário é restrito aos casos onde há, de fato, uma herança genética dentro da família (Thomas, 2004).

### **Busca de genes associados à etiologia de características complexas**

Tendo obtido evidências de fatores genéticos associados à etiologia de determinadas características ou doenças, o próximo passo é localizar e identificar o(s) gene(s) envolvido(s). Uma opção é direcionar a pesquisa para os genes candidatos óbvios, isto é, genes cujos produtos podem estar relacionados diretamente com a etiologia. Porém, para fenótipos mais complexos existem tantos candidatos e tantos genes cujos efeitos usuais são completamente desconhecidos que este trabalho deve ser precedido por uma tentativa de localizar primeiro as regiões do genoma de relevante interesse (Burton *et al.*, 2005).

Um tipo de abordagem é o estudo de associação. Com essa estratégia, busca-se uma associação estatística entre a ocorrência da característica e genótipos de regiões conhecidas do genoma. Porém, com esse tipo de análise não é possível afirmar se a associação observada reflete ou não a localização genômica ou é consequência de uma interação gênica (Botstein & Risch, 2003).

A análise de ligação gênica é uma outra estratégia para tentar encontrar a localização cromossômica de genes. O objetivo dessa estratégia é a busca de co-segregação entre marcadores genéticos moleculares e o fenótipo de interesse em famílias numerosas, que são particularmente informativas para esse propósito, que tenham vários indivíduos afetados. Marcadores genéticos moleculares polimórficos são regiões do genoma que apresentam variação (alelos) que pode ser identificada e

quantificada. Um dado *locus* gênico é considerado um marcador se a frequência populacional do alelo mais comum apresentar um valor de no máximo 99% (polimorfismo) (Rao e Province, 2001).

A busca pela localização genômica pode ser iniciada independente de conhecimento prévio sobre os genes envolvidos na etiologia de uma dada característica ou doença. Nesse caso, inicia-se a busca utilizando um conjunto de marcadores genéticos bastante espaçados, espalhados ao longo do genoma inteiro, um processo conhecido como escaneamento genômico. À medida que sinais de ligação gênica forem sendo encontrados é possível reduzir a área de busca ampliando o número de marcadores em uma área genômica específica, isto é, aplicando técnicas de refinamento. Por outro lado, caso haja informações prévias com relação aos cromossomos que poderiam estar envolvidos, marcadores específicos, localizados próximos àquela região, podem ser usados na busca (Thomas, 2004).

Quando a região candidata for suficientemente pequena e não for possível encontrar nenhum gene candidato naquela região, pode-se examinar exaustivamente o DNA naquele trecho, buscando-se polimorfismos. Através de várias técnicas moleculares, e mais recentemente com a ajuda dos bancos de dados com as seqüências obtidas a partir do Projeto Genoma Humano, é possível identificar as seqüências codificadoras e escanear cada uma a procura de polimorfismos. Os polimorfismos que forem encontrados nos afetados e que forem raros nos não afetados são considerados como possíveis mutações causais. Uma mutação causal pode ocorrer em uma região não-codificadora, tal como uma região reguladora; nesse caso, o sequenciamento da região candidata se torna necessário (Botstein e Risch, 2003).

Finalmente, uma vez identificado o gene, estuda-se o mesmo objetivando uma melhor compreensão da etiologia da característica em questão e, com isso, viabilizar diagnósticos e terapias quando for o caso.

O Organograma mostrado na Figura 1 é um resumo de uma seqüência de investigações usada para identificação e caracterização de determinantes genéticos de doenças complexas. Entretanto, nem sempre todas as fases descritas são executadas durante o processo investigativo. Evidências históricas, facilidade de recrutamento de populações a serem estudadas e redução no custo de genotipagem são algumas das razões pelas quais uma ou mais das etapas descritas podem ser eliminadas ou ter sua ordem alterada. Porém, a compreensão apropriada a respeito das bases lógicas de cada

uma das etapas ajuda na decisão de quando tomar um atalho é razoável (Burton *et al.*, 2005).

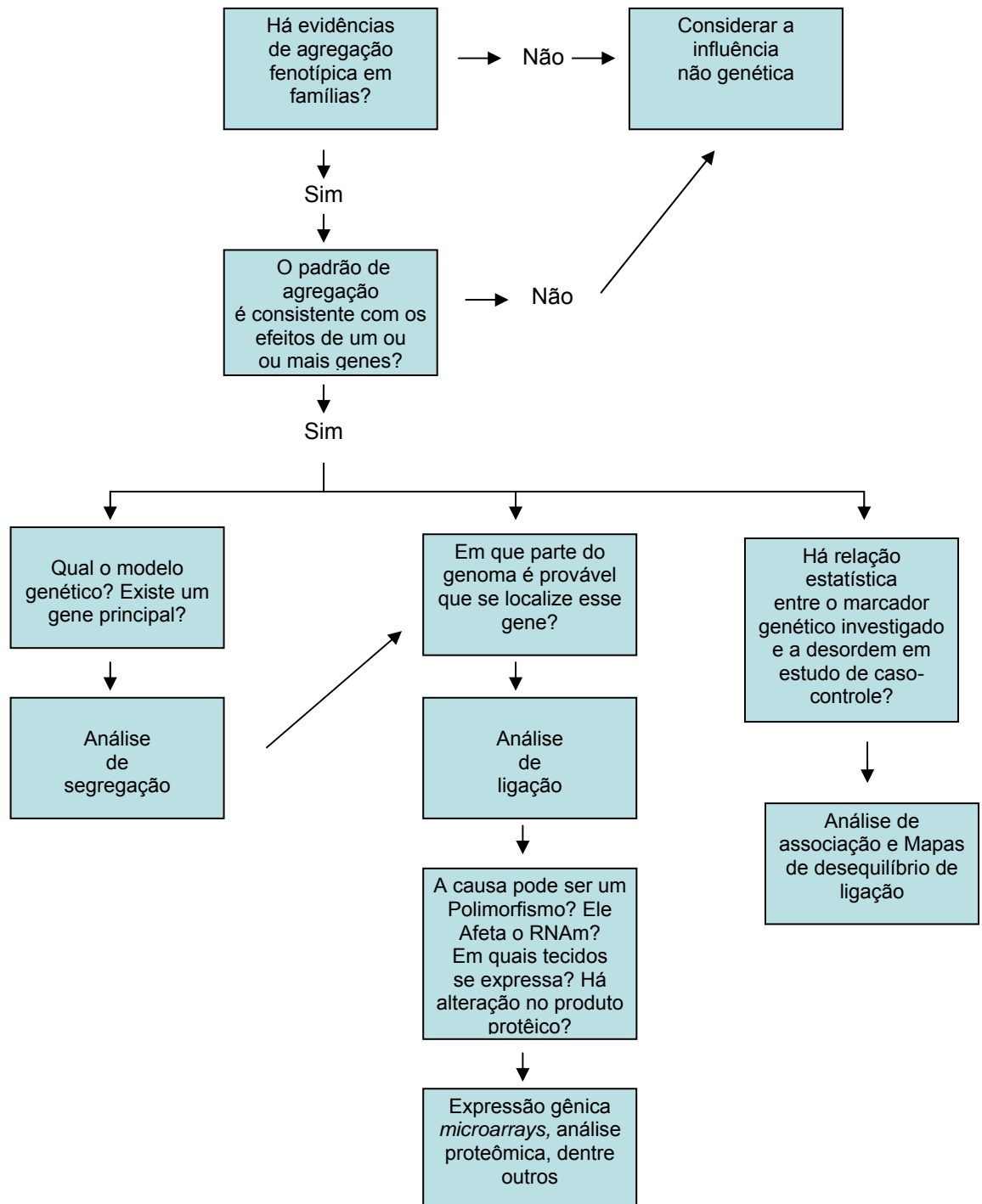


FIGURA 1 – Organograma mostrando a abordagem sistemática para identificação e caracterização dos determinantes genéticos de fenótipos complexos (Adaptado de Burton *et al.*, 2005).

## II - Análise genética dos problemas craniofaciais

### **Crescimento e desenvolvimento craniofacial: influência gênica**

Em um dos trabalhos clássicos e mais conhecidos a respeito do crescimento e desenvolvimento craniofacial, foi sugerido que não havia uma contribuição genética direta para a morfogênese esquelética: o fenótipo seria determinado somente através das matrizes funcionais (Moss, 1975). Porém essa visão era muito reducionista. Mais tarde, os papéis dos fatores genéticos e epigenéticos na morfologia craniofacial final foram reconsiderados e foi sugerido que a síntese ou interações genes-ambiente são peças fundamentais na ontogênese (Moss, 1997).

Muitos genes já foram identificados como tendo um importante papel no desenvolvimento do complexo craniofacial. Porém, ainda falta identificar o papel preciso de cada um e quais as interações que ocorrem entre eles e com o ambiente, pois a maior parte das anomalias craniofaciais não são características monogênicas (El-Gheriani *et al.*, 2003; Mah, 2001; Mossey, 1999<sup>b</sup>, Singh *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1981; Fox e Crary, 1971; Litton *et al.*, 1970).

Várias malformações do crânio, face, dos ossos maxilares e dentes têm tido sua etiologia ligada a fatores genéticos. Poderíamos citar alguns exemplos como: craniosinostose (Jabs *et al.*, 1993), microssomia hemifacial (Mossey, 1999<sup>a</sup>), displasia ectodérmica (Kere *et al.*, 1996), displasia cleidocranial (Mundlos *et al.*, 1997), fissuras palatinas (Satokata *et al.*, 1994), prognatismo mandibular (Yamaguchi *et al.*, 2005; El-Gheriani *et al.*, 2003; Mah, 2001), anodontias (Vastardis, 2000; Vastardis *et al.*, 1996), amelogênese (Crawford & Aldred, 1992) e dentinogênese imperfeitas (Nichols *et al.*, 1996).

Os desafios para os tratamentos clínicos dos problemas craniofaciais são muitos: diagnósticos precisos, previsões de crescimento, efetividade e estabilidade nos resultados dos tratamentos, e, em muitos casos, aconselhamentos genéticos. O sucesso para gerenciar esses desafios passa pela compreensão dos mecanismos genéticos básicos do crescimento e desenvolvimento craniofacial. De acordo com a literatura, os fatores genéticos são claramente predominantes durante a morfogênese craniofacial embriológica, enquanto que o ambiente é o principal fator quando se considera a morfologia dentofacial pós-natal, particularmente durante o crescimento da face (Dohmoto *et al.*, 2002; Mossey, 1999<sup>b</sup>; Fox e Crary, 1971).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias e análises estatísticas, estima-se que nas próximas décadas, um amplo escaneamento pré-natal para anomalias craniofaciais seja, provavelmente, um procedimento de rotina (Mah, 2001). Porém, devido à natureza dos problemas craniofaciais, onde o crescimento se dá de forma interdependente, é essencial que cada malformação craniofacial possa ser estudada separadamente. Neste estudo escolheu-se o prognatismo mandibular por diversas razões.

Uma questão importante na análise dessa desordem é que os métodos de medidas e descrições das diferenças na forma e no tamanho mandibulares são considerados eficazes (Bui *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 1998<sup>a</sup>; Singh *et al.*, 1998<sup>b</sup>). Além disso, o prognatismo mandibular não é uma característica rara na população brasileira, apesar de poucos e isolados trabalhos terem feito até o momento uma avaliação da incidência no país (Martins *et al.*, 1994). Estima-se que no Brasil não seja tão prevalente quanto em outras populações como a japonesa e a coreana, mas com uma incidência intermediária entre africanos sub-saarianos e europeus.

Estudos prévios feitos em humanos (Yamaguchi *et al.*, 2005; El-Gheriani *et al.*, 2003; Mah, 2001; Arienza, 1971) e evidências de estudos feitos em animais (Dohmoto *et al.* 2002, Huang *et al.*, 1981; Fox e Crary, 1971) dão sustentação à tese de que existe uma base genética para o prognatismo mandibular. Porém, a relação entre fenótipo e os genes responsáveis pela forma da mandíbula é difícil de ser acessada uma vez que provavelmente haja o envolvimento de vários genes.

Há um grande interesse clínico no prognatismo mandibular por parte dos ortodontistas e ortopedistas faciais uma vez que essa característica é um dos problemas mais difíceis de serem tratados. Apesar disso, existem poucos artigos publicados na literatura tentando mostrar características do modelo genético ou da localização cromossômica do gene responsável (Yamaguchi *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2004; El-Gheriani *et al.* 2003).

## **Prognatismo Mandibular**

### **Morfologia, etiologia, prevalência e tratamento**

Como dito anteriormente, um dos maiores problemas da ortodontia e ortopedia facial ao longo de sua história tem sido o tratamento de pacientes com prognatismo mandibular. Em geral, esse tipo de maloclusão não se apresenta como um problema



clínico único, mas como uma desordem heterogênea que pode estar associada a diversas combinações de componentes dentários e esqueléticos (Singh, 1999). Determinadas características craniofaciais são encontradas como estando mais relacionadas a esse fenótipo (TABELA 1). Todas essas características produzem uma face típica, facilmente reconhecida como prognatismo mandibular, apesar de que não seja necessária a presença de todas elas para estabelecer o diagnóstico (Singh, 1999). A falta de harmonia na relação entre maxila e mandíbula talvez seja um dos principais fatores que leva um paciente em potencial a procurar ativamente um tratamento ortodôntico (Singh, 1999; Singh *et al.*, 1998<sup>a</sup>). No Japão e na Coreia 50% dos pacientes ortodônticos procuram tratamento em virtude do prognatismo mandibular (Yang 1990; Ishii *et al.*, 1987).

**TABELA 1:** Características craniofaciais relacionadas ao prognatismo mandibular

<b>Característica</b>	<b>Referência</b>
Ângulo agudo da base do crânio	1, 2, 3, 4
Comprimento diminuído da base anterior do crânio	2, 3, 4, 5
Maxila curta e retruída	1, 3
Mandíbula alongada e proeminente	1, 3
Mandíbula posicionada mais para anterior	1
Ramo mandibular curto	1
Ângulo do plano mandibular obtuso	1
Ângulo goníaco obtuso	3, 6
Perfil facial côncavo	3
Hipofunção do músculo <i>mentalis</i>	3
Lábio inferior mais espesso	3
Deficiência de terço médio de face	3
Região malar mais achatada	3
Pálpebras inferiores moderadamente evertidas	3

1. Singh *et al.*, 1998<sup>a</sup>; 2. Singh *et al.*, 1997; 3. Thompson e Winter, 1988; 4. Ellis e McNamara, 1984; 5. Mossey, 1999<sup>b</sup>; 6. Arienza, 1971.

Apesar dos vários anos de investigação, a contribuição relativa de fatores genéticos e ambientais na etiologia do prognatismo mandibular ainda não está esclarecida (Yamaguchi *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2005; El-Gheriani *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 1998<sup>b</sup>; Fox e Crary, 1971; Litton *et al.*, 1970). Alguns autores afirmam que

tal fato é decorrente da hererogeneidade fenotípica e do conhecimento limitado acerca dos mecanismos genéticos envolvidos e da natureza e efeitos precisos da influência do ambiente (Bui *et al.*, 2006; El-Gheriani *et al.*, 2003; Mossey, 1999<sup>b</sup>; Huang *et al.*, 1981; Fox e Crary, 1971).

Um dos principais centros de crescimento da mandíbula, a cartilagem dos côndilos mandibulares, apresenta um potencial intrínseco de crescimento e é suscetível a alterações biofísicas ambientais (McNamara e Carlson, 1979). É altamente provável que em pacientes com prognatismo mandibular, tais condições biomecânicas possam ser precipitadas pela herança de genes que predisponham a uma morfologia craniofacial associada àquele fenótipo (El-Gheriani *et al.*, 2003; Singh, 1999). As características do desenvolvimento das cartilagens mandibulares ainda não estão totalmente compreendidas, e sua contribuição morfológica no desenvolvimento das maloclusões Classe III permanece obscura (Singh *et al.*, 1998<sup>b</sup>; Fox e Crary, 1971).

O papel da hereditariedade na etiologia do prognatismo mandibular é sugerido pela observação de agregações familiares, pois a literatura tem mostrado uma incidência significativamente alta de prognatismo mandibular em parentes de probandos afetados (Yamaguchi *et al.*, 2005; El-Gheriani *et al.*, 2003; Wolff *et al.*, 1993; Penna e Pena, 1988; Kraus *et al.*, 1959).

No que se refere aos fatores ambientais, os casos de prognatismo mandibular têm sido associados a diversas etiologias. Dentre elas estão amídalas hipertrofiadas (Angle, 1907), disfunções endócrinas e desequilíbrios hormonais (Pascoe *et al.*, 1960; Downs, 1928), problemas posturais, traumas e outras doenças (Mossey, 1999<sup>b</sup>; Gold, 1949), perdas prematuras de dentes (Gold, 1949), desenvolvimento muscular (Singh, 1999; Avis, 1959), bloqueio das vias aéreas superiores (Davidov *et al.*, 1961), defeitos anatômicos congênitos (Monteleone e Duvigneaud, 1963) e distúrbios na erupção dentária (Schoenwetter, 1974; Dempster *et al.*, 1963).

O prognatismo Mandibular mostra uma baixa prevalência nas populações euro-americanas (0,48 a 4%), maior na população sub-saariana africana (3 a 8%), e maior ainda entre as populações asiáticas do extremo oriente (coreanos, chineses e japoneses), onde a prevalência atinge de 6,37 a 40% da população (Yamaguchi *et al.*, 2005; El-Gheriani *et al.*, 2003; MHLW, 1999; Saleh, 1999; Mah, 2001; Ishii *et al.*, 1987; Miotti, 1982, Litton *et al.*, 1970; Allwright *et al.*, 1964; Davidov *et al.*, 1961). A incidência altera com a idade. Por exemplo, em populações euro-descendentes a prevalência pode variar de 0,5% nas crianças de 6-14 anos de idade (Newman, 1965) até um patamar de

2-4% em adultos (Jorgensen, 1990). A diferença significativa encontrada nas frequências descritas pelos diversos autores se deve mais aos métodos diversos para exame e classificação do que às discrepâncias entre as populações estudadas (Miotti, 1982; Ast *et al.*, 1965).

Este fenótipo pode ser percebido em idades bem precoces e, em geral, se torna progressivamente mais evidente com o crescimento. Devido à discrepância entre maxila e mandíbula, esses pacientes encontram dificuldade para mastigar adequadamente, desgastam seus dentes prematuramente, podem desenvolver disfunções têmporo-mandibulares e problemas de fala, experimentar dificuldade no fechamento da boca e selamento labial e frequentemente sofrem estigma social em função de sua aparência facial (Mah, 2001; Arienza, 1971).

O tratamento clínico do prognatismo mandibular depende das características faciais, dentárias e esqueléticas do paciente, bem como de sua idade. Se o tratamento começa durante a infância, geralmente envolve uma expansão rápida da maxila e uma concomitante protração maxilar (com máscara facial), ao mesmo tempo em que se faz um controle do crescimento mandibular (com a própria máscara facial ou com o uso noturno de mentoneiras). Em geral as técnicas ortodônticas e ortopédicas são usadas no tratamento com efetividade limitada. Elas podem melhorar a oclusão dental, mas raramente melhoram o aspecto facial, que representa exatamente a queixa principal dos pacientes (Ishii *et al.*, 1987; Arienza, 1971).

Então, em um grande número de casos, mesmo tendo sido empregado procedimentos interceptativos durante a infância, o crescimento mandibular excede o maxilar de tal maneira durante o surto de crescimento da puberdade, que a única solução é proceder a uma cirurgia ortognática após a completa maturação esquelética (Watanabe *et al.*, 2005; Ishii *et al.*, 1987). O recuo mandibular cirúrgico envolve geralmente osteotomias sagitais no ramo ou no corpo da mandíbula (Watanabe *et al.*, 2005). Indivíduos com Classe III esquelética devido ao prognatismo mandibular são mais propensos a procurar uma avaliação profissional para corrigir cirurgicamente o problema que aqueles que possuem deficiência mandibular (Proffit *et al.*, 1990).

Um dos maiores desafios no tratamento de pacientes com prognatismo mandibular é prever o crescimento, pois isto é fundamental para tomar decisões a respeito da época, do modo de tratamento e do tipo de contenção a ser utilizado. Um dilema comum diz respeito ao tratamento precoce, com redirecionamento do crescimento, enquanto aguarda-se o surto de crescimento da puberdade. Pode-se desta

maneira tentar controlar o crescimento e fazer com que o paciente escape da opção cirúrgica. Mas esta abordagem condena o paciente a um longo e cansativo tratamento.

Outro dilema diz respeito às respostas variáveis que diferentes pacientes apresentam a um mesmo tratamento (Mah, 2001). Observa-se na clínica ortodôntica que, quando comparado com os casos esporádicos, os casos familiares de prognatismo mandibular parecem ter um prognóstico de tratamento mais incerto. Esses casos geralmente evoluem desfavoravelmente, exigindo uma cirurgia ortognática para correção da relação entre as bases ósseas superior e inferior ao final do processo de maturação esquelética (Capellozza *et al.*, 1996).

Apesar de todas essas dificuldades, a correção ortodôntica do prognatismo mandibular, pode de fato, alterar a expressão do fenótipo de um determinado padrão morfogenético (Capellozza *et al.*, 1996). Mas, o grau de sucesso que pode ser alcançado depende da contribuição relativa dos fatores genéticos e ambientais na etiologia do problema existente, que é impossível de ser determinado hoje, e da extensão na qual o padrão esquelético pode ser influenciado pelos aparelhos ortodônticos e ortopédicos (Mossey, 1999<sup>b</sup>). Há esperanças de que em um futuro próximo possamos responder a perguntas tipo: Poderia a genética predispor um paciente a uma determinada resposta a um dado tratamento? Esses genes são expressos em uma determinada época do desenvolvimento? Se forem, essa época seria a melhor época para o tratamento?

As chaves para a determinação da etiologia desta maloclusão e a melhor maneira de encarar o problema estão exatamente na habilidade de diferenciar os efeitos de genes e ambiente sobre o esqueleto craniofacial de um indivíduo em particular. A habilidade para isso é limitada pela falta de conhecimento dos mecanismos genéticos responsáveis pelo crescimento facial e pela falta de evidências científicas a respeito da influência dos fatores ambientais sobre a morfogênese craniofacial humana (Mossey, 1999<sup>a</sup>).

### **O papel da genética na ocorrência do prognatismo mandibular**

Há uma tendência familiar ao prognatismo mandibular (Yamaguchi *et al.* 2005; Dohmoto *et al.* 2002; Mah, 2001; Singh, 1999; Arienza, 1971). Provavelmente, o exemplo mais famoso de uma característica genética em humanos que vem sendo transmitida através de várias gerações seja aquela presente na dinastia dos Habsburgos. Já se mostrou a presença do prognatismo mandibular em várias gerações dessa família de nobres da monarquia austro-húngaro (Strohmayer, 1937), assim como na família

imperial brasileira (Pena e Penna, 1988). Também já foi estudado em gêmeos uni e bivitelinos, onde se mostrou que a concordância em univitelinos era seis vezes mais alta que em gêmeos bivitelinos (Schulze e Weise, 1965), o que indica um componente genético importante.

Da mesma maneira, modelos animais têm ajudado a estudar a influência da genética na forma da mandíbula. Foi sugerido que o prognatismo mandibular apresente um padrão de herança autossômico recessivo com penetrância incompleta em coelhos (Huang *et al.*, 1981; Fox e Crary, 1971). Regiões cromossômicas responsáveis pelo comprimento mandibular já foram mapeadas para camundongos. Valores de LOD scores com níveis significativamente altos foram encontrados em torno da região localizada a 60 cM do centrômero do cromossomo 10 e ao redor das regiões localizadas a 13 cM e a 16 cM do centrômero do cromossomo 11 desses animais. O escaneamento da base de dados do genoma do camundongo revelou mais de 10 genes candidatos a determinação do comprimento mandibular, localizados nos cromossomos 10 e 11. Essas posições correspondem respectivamente às regiões 12q21 e 2p13 do cromossomo humano. Sendo assim, é possível que polimorfismos naquelas regiões cromossômicas pudessem ser utilizados na previsão do tamanho da mandíbula antes do término do crescimento do indivíduo (Dohmoto *et al.*, 2002).

Uma variedade de modelos genéticos tem sido empregadas para explicar a agregação familiar do prognatismo mandibular. O padrão de herança é controverso e varia entre famílias (Yamaguchi *et al.*, 2005; El-Gheriani *et al.*, 2003; Miotti, 1982). Para alguns autores o prognatismo mandibular é uma característica poligênica com um limiar de expressão na grande maioria dos casos (El-Gheriani *et al.*, 2003; Mossey, 1999<sup>b</sup>; Wolff *et al.*, 1993; Bailey, 1985; Miotti, 1982; Huang *et al.*, 1981; Litton *et al.*, 1970). A exceção ocorreria em poucas famílias onde o fenótipo estaria associado com uma síndrome; nesses casos um único gene dominante seria o responsável pelo problema (Wolff *et al.*, 1993).

O prognatismo mandibular tem sido visto como sendo uma característica autossômica dominante (McKusick, 1972; Strohmayer, 1937; Rubbrecht, 1930) ou uma característica dominante com penetrância incompleta (Yamaguchi *et al.*, 2005; El-Gheriani *et al.*, 2003; Mah, 2001; Mossey, 1999<sup>b</sup>; Wolff *et al.*, 1993; Miotti, 1982; Huang *et al.*, 1981; McKusick, 1972; Grabb *et al.*, 1968; Kraus *et al.*, 1959; Stiles e Luke, 1953). Porém, há relatos de que seja herdado seguindo um modelo autossômico recessivo (Iwagake, 1938; Downs, 1928). Essa desordem é ainda uma das características

das síndromes XXY, XXXY e XXXXY e nesses casos quanto maior o número de cromossomos X, mais afetado seria o fenótipo (Miotti, 1982; Gorlin *et al.*, 1965). Porém, apesar do papel exercido pelo cromossomo X, não seria uma herança ligada ao X (Gorlin *et al.*, 1965).

Apesar dos modelos genéticos diferirem, sabe-se que um entendimento da etiologia e expressão é fundamental para a compreensão de suas bases genéticas. De acordo com estudos prévios (Yamaguchi *et al.*, 2005; El-Gheriani *et al.*, 2003), essa característica parece ser geneticamente complexa, multifatorial, poligênica, ao mesmo tempo em que o(s) gene(s) envolvido(s) parece(m) ser pleiotrópico(s). E é nesse contexto que devemos analisar o prognatismo mandibular.

Fenótipos assim representam um problema particular para os geneticistas, pois frequentemente mostram uma recorrência familiar aumentada, mas com um padrão de herança nem sempre facilmente identificável, uma vez que apresentam também penetrância incompleta, heterogeneidade clínica além da possibilidade da presença de fenocópias. Desta maneira, utilizando metodologias eficazes de análise laboratorial e de dados em análises de segregação e de ligação, espera-se que seja possível demonstrar a contribuição genética na expressão fenotípica e que se consiga encontrar evidências da localização cromossômica dos genes responsáveis por essas doenças ou malformações (Burton *et al.*, 2005; Teare e Barret, 2005; Thomas, 2004; Rao *et al.*, 2001; Durner e Greenberg, 1992).

A localização desses genes será importante para o tratamento clínico do prognatismo mandibular. Prevê-se que trabalhos futuros poderão identificar genes candidatos dentro do genoma humano, de maneira a tentar prever quais indivíduos estariam mais suscetíveis a desenvolver o problema. Da mesma maneira, estudos poderão revelar as interações gene-ambiente associadas com a diversidade fenotípica dessas maloclusões e os mecanismos de desenvolvimento heterogênicos responsáveis por elas. A identificação de genes candidato pode permitir um diagnóstico clínico mais preciso e uma intervenção mais precoce, enquanto o complexo craniofacial ainda em desenvolvimento está mais sensível a tratamentos profiláticos (Singh, 1999).

## *CAPÍTULO 1*

*Avaliação de heredogramas e análise de segregação do prognatismo mandibular em famílias brasileiras*

## **I Introdução**

A prevalência do prognatismo mandibular varia de acordo com a origem étnica da população. A maior prevalência é encontrada nas populações asiáticas, como coreanos, chineses e japoneses, onde a incidência varia de 6,37 a 40%. As populações africanas sub-saarianas mostram uma prevalência também elevada (3 a 8%), enquanto que as populações de origem européia apresentam as frequências mais baixas (0,48 a 4%) (Yamaguchi *et al.*, 2005; El-Gheriani *et al.*, 2003; MHLW, 1999; Saleh, 1999; Mah, 2001; Ishii *et al.*, 1987; Miotti, 1982; Litton *et al.*, 1970; Allwright *et al.*, 1964; Davidov *et al.*, 1961).

No entanto, grande parte dos estudos apresenta resultados diversos, provavelmente muito mais por razões de métodos diferentes de exame e de classificação do que propriamente por discrepâncias nas populações estudadas (Miotti, 1982; Ast *et al.*, 1965). As diferenças de metodologia entre os diversos estudos envolvem normalmente a idade de averiguação, havendo uma prevalência de levantamentos entre indivíduos em idade escolar.

Por exemplo, foi encontrada uma prevalência de 5% de prognatismo mandibular entre indivíduos em idade escolar no Líbano (Saleh, 1999). No Canadá, a prevalência averiguada entre os jovens esquimós *Inuit*, moradores da região de Labrador, de 5 a 22 anos de idade foi de 16% (Zammit *et al.*, 1995). A prevalência encontrada em um grupo de estudantes do sexo masculino de 16 a 32 anos de idade nos Estados Unidos também foi alta: 12,2%, (Huber e Reynolds, 1946); o mesmo ocorreu na Alemanha, onde 2758 estudantes de 14 a 18 anos foram avaliados e foi encontrado um percentual de 11,9% (Massler e Frankel, 1951). Já na Inglaterra, em uma amostra de 2956 estudantes ingleses entre 7 e 15 anos de idade, apenas 2,95% apresentava prognatismo mandibular (Goose *et al.*, 1957). Na Dinamarca, o percentual encontrado em 3842 indivíduos entre os 7 e os 18 anos de idade também foi baixo, não chegando a 2% (Helm, 1970). No Brasil, não existem muitos dados. Acredita-se que a frequência do prognatismo mandibular fique entre 1 e 3% (Martins *et al.*, 1994).

Com relação ao padrão de herança do prognatismo mandibular, já foram sugeridos diversos modelos e também não há um resultado coincidente entre os trabalhos existentes até o momento. Uma forte influência genética foi observada na transmissão da característica em famílias de 51 probandos nos Estados Unidos, sendo que aproximadamente 13% dos irmãos dos probandos também eram afetados. Porém, os



resultados não apoiaram a idéia de herança autossômica puramente dominante ou recessiva e foi sugerida uma herança multifatorial (Litton *et al.*, 1970). Por outro lado, as hipóteses de herança autossômica dominante ou recessiva não foram descartadas pela análise de segregação em famílias da Líbia (El-Gheriani *et al.*, 2003). A avaliação de 13 famílias de nobres europeus com prognatismo mandibular, com 409 membros e 23 gerações, sugeriu um modelo autossômico dominante com penetrância incompleta (Wolff *et al.*, 1993).

A forte influencia genética também foi sugerida em 105 famílias japonesas acessadas a partir de pacientes que iam ser ou já haviam sido submetidos a correções cirúrgicas do prognatismo mandibular. Destas famílias examinadas, envolvendo três gerações de familiares e 1480 indivíduos, 68,6% apresentaram pelo menos um membro afetado além do probando. A prevalência de afetados foi duas vezes maior para os parentes de primeiro grau (mães, pais e irmãos - 17,5%) do que para os de segundo grau (avós e tios - 7,6%). A prevalência para parentes de terceiro grau (primos) foi de 10,8% (Watanabe *et al.*, 2005).

Desta forma, essa falta de consenso quanto ao modelo genético do prognatismo mandibular parece refletir a existência de um alto grau de heterogeneidade, indicando aparentemente que mais de um gene pode estar envolvido na transmissão. Sendo assim, é importante que mais pesquisas sejam realizadas, em diferentes populações, para que se possa definir melhor o modelo de herança dessa característica, bem como outros parâmetros, tais como penetrância e herdabilidade.

### **Avaliação de heredogramas e análise de segregação**

O principal objetivo em se analisar heredogramas é avaliar a ocorrência ou não de um ou mais componentes genéticos relevantes, assim como buscar um modelo genético que melhor explique a segregação familiar de uma dada característica. O modelo genético é estimado pelo padrão familiar de uma dada característica e pode fornecer informações preliminares sobre a localização genômica e sobre dominância e recessividade. Essa primeira avaliação é baseada, principalmente, na distribuição de ocorrência entre os dois sexos e na segregação entre gerações.

A análise complexa de segregação é uma técnica usada para identificar qual o melhor modelo genético que explica a agregação familiar observada para uma dada característica. Busca saber se o mesmo ocorre devido a um ou mais genes principais,

poligenes ou inter-relação gene-ambiente. Em outras palavras, é o processo de adequar os dados de modelos genéticos formais aos fenótipos de membros de uma família, geralmente determinados através de probandos afetados. As informações obtidas nesse tipo de análise podem ser usadas para gerar os parâmetros que serão empregados em análises paramétricas de ligação (Burton *et al.*, 2005; Thomas, 2004).

A análise de segregação clássica não requer informações a respeito dos genótipos. Trata-se de uma investigação da agregação familiar, focando o padrão de segregação dentro de cada família individualmente, ao invés de se usar a média da população, sendo que os resultados podem variar, por vezes sensivelmente, de acordo com os métodos de avaliação empregados (Burton *et al.*, 2005; Thomas, 2004).

Uma dificuldade comum na coleta de dados em heredogramas humanos é que geralmente estão disponíveis para análise as famílias de pequeno tamanho e com poucas gerações acessíveis. Apesar de ser possível fazer esse tipo de análise em núcleos familiares ou em heredogramas pequenos, os heredogramas mais extensos são mais informativos (Rao e Province, 2001). A identificação e caracterização da amostra a ser estudada são de suma importância, uma vez que determinam o subsequente desenho do estudo a ser empregado e a escolha da análise estatística mais apropriada. Especial atenção deve ser prestada aos critérios de inclusão e exclusão de probandos e na exatidão na caracterização clínica do fenótipo em questão. Este é um ponto fundamental em análises de segregação e de ligação, pois um erro de diagnóstico pode ter efeitos graves sobre os resultados (El-Gheriani, 2003; Mah, 2001).

O primeiro passo no estudo de uma característica potencialmente genética é verificar se ela tende a se agregar em famílias, sem que até esse momento se tenha nenhum modelo genético em mente. Muitas das complicações da epidemiologia genética surgem da necessidade de se procurar famílias ao invés de indivíduos. Além disso, no estudo de fenótipos complexos como o prognatismo mandibular, uma complicação adicional é que famílias com múltiplos casos, que são as mais informativas, não são eficientemente identificáveis quando as famílias são escolhidas aleatoriamente no meio da população em geral. Por essas razões a maioria dos estudos de agregação familiar de doenças é geralmente baseada na verificação de probandos, seguido pela identificação dos membros de suas famílias (Thomas, 2004; Gass *et al.*, 2003).

Dentre os parâmetros que podem ser estimados em uma análise de segregação está a penetrância. Ela é um termo estatístico que indica a proporção de indivíduos que

carregam certo genótipo e o fenótipo conseqüente. A penetrância incompleta, isso é, ausência de expressão fenotípica em indivíduos que apresentam um dado genótipo, é comum quando se trata de características complexas. À medida que melhora nossa habilidade para detectar a expressão de um gene, aumenta a penetrância. Uma penetrância completa em um padrão de herança autossômico significa que o fenótipo estará presente em cada geração, com um dos pais sempre afetados em cada casal, sempre que houver um indivíduo de sua prole também afetado. A presença de fenocópias e/ou penetrância incompleta produz uma exceção a esta regra. Uma fenocópia não é capaz de transmitir o fenótipo para nenhum de seus descendentes, nem terá ancestrais afetados, a não ser que eles também sejam fenocópias. Uma determinada característica fenotípica com penetrância variada entre diferentes famílias pode ser um sinal de heterogeneidade de *locus* (Thomas, 2004).

Outro parâmetro que está muito relacionado às avaliações de heredogramas e análises de segregação é a herdabilidade. O conceito de herdabilidade foi desenvolvido no contexto da genética quantitativa e é definido como a proporção da variância fenotípica total que pode ser atribuída a fatores genéticos (Gass *et al.*, 2003; Rao e Province, 2001; Mossey, 1999<sup>b</sup>). Matematicamente, seu valor varia entre zero e um, sendo que o limite inferior (zero) ocorre quando todas as variâncias fenotípicas observáveis são atribuídas a fatores não-genéticos e o superior (um) quando são atribuídas exclusivamente à composição genética (Gass *et al.*, 2003).

Em princípio, um determinado fenótipo sob controle mendeliano poderia apresentar uma herdabilidade de 0 (zero), se todos os indivíduos da população examinada tivessem o mesmo genótipo, porém apresentassem variância fenotípica. Nesse caso, toda variância observada seria decorrente do componente ambiental. Por outro lado, a herdabilidade poderia se aproximar de 1 (um) quando toda variância fenotípica pudesse ser explicada pela variância genotípica (Gass *et al.*, 2003).

Uma maior diversidade nos fatores ambientais diminui o valor da herdabilidade, mesmo que o mecanismo biológico básico seja idêntico. De maneira similar, populações com composições genéticas básicas homogêneas apresentam valores mais baixos de herdabilidade (Gass *et al.*, 2003).

Conseqüentemente, a herdabilidade para um dado fenótipo pode variar substancialmente entre e mesmo dentro de um mesmo cenário. Uma visão errônea da herdabilidade é considerar que a mesma seja a extensão na qual uma determinada característica pode ser causada por fatores genéticos. Se uma característica depende de

um determinado alelo para o qual todos são homozigotos, a variância para aquele *locus* não terá nenhum papel na determinação da variância da característica, e não contribuirá para a herdabilidade. Uma exposição ambiental quase onipresente trará pouca ou nenhuma contribuição ao denominador. A interpretação também depende de quais co-variáveis serão incluídas. Por exemplo, incluir uma co-variável ambiental importante pode bem diminuir a variância fenotípica total, sem alterar a variância decorrente de fatores genéticos, o que iria aparentemente aumentar a herdabilidade (Burton *et al.*, 2005; Rao e Province, 2001).

A importância básica do cálculo de herdabilidade é o seu uso na inferência de sucesso na busca de genes relacionados a características. O potencial de sucesso na busca de genes está positivamente associado com a herdabilidade da característica de interesse. Então, se a opção existe, a eficiência analítica pode ser aumentada selecionando-se uma população na qual se acredita que a herdabilidade da característica em estudo seja alta. O conhecimento de que a característica de interesse tem alta herdabilidade pressupõe um prognóstico favorável às investigações dos determinantes genéticos daquela característica. Por outro lado, se a herdabilidade é baixa, se pode prever que haverá muitas dificuldades para se encontrar os efeitos genéticos (Burton *et al.*, 2005).

## **II Proposição**

O objetivo desse estudo foi avaliar a transmissão familiar do prognatismo mandibular em 55 famílias brasileiras, onde havia, no mínimo, um membro afetado (probando), visando:

a) sugerir um padrão de herança para essa característica nessas famílias baseado na análise visual de heredogramas;

b) estabelecer a distribuição do prognatismo mandibular por gênero assim como a prevalência entre irmãos, pais e avôs de probandos nessas famílias,

c) estimar a herdabilidade e a penetrância do prognatismo mandibular nessas famílias,

d) aplicar métodos de análise complexa de segregação para estabelecer o padrão de herança do prognatismo mandibular nessas famílias.

### **III Material e Métodos**

#### **Amostragem**

Foram selecionados 55 probandos com prognatismo mandibular em arquivos de clínicas privadas de Ortodontia e de Cirurgia buco-maxilo-facial de Brasília (DF), Brasil. Os pacientes foram selecionados de acordo com o diagnóstico ortodôntico de maloclusão de Classe III de Angle (Angle, 1907), baseado nos exames clínicos, fotográficos e radiográficos de rotina dos tratamentos ortodônticos. Apesar dos pacientes já terem sido diagnosticados e até mesmo tratados naquelas clínicas por outros profissionais, o diagnóstico de prognatismo mandibular foi reconfirmado.

Na ocasião, detalhes do estudo foram explicados aos pacientes e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participar do estudo foi obtido (ANEXO 1). Para os menores de idade, o TCLE foi assinado pelos pais ou responsáveis. Os probandos foram orientados a explicar aos seus parentes os objetivos gerais da pesquisa, bem como as linhas gerais da metodologia de coleta do material a ser empregada. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília (CEP-UnB) e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Os probandos cujos fenótipos não puderam ser identificados ou aqueles suspeitos de serem casos sindrômicos não foram incluídos da amostra. Para identificar e excluir possíveis casos sindrômicos foi utilizada como referência a lista das 27 desordens genéticas nas quais o prognatismo mandibular estava incluído como uma das características clínicas (TABELA I) (OMIM, 2006). Da mesma maneira, pacientes que apresentaram defeitos congênitos, como fenda palatina, ou apresentassem doenças físicas gerais foram igualmente excluídos da amostra.

As famílias selecionadas tinham no mínimo três gerações acessíveis. Os pacientes que preencheram todos os requisitos de seleção foram entrevistados e forneceram as informações necessárias para que os desenhos dos heredogramas pudessem ser feitos.

A faixa etária dos probandos variou de 7a 7m a 52a 8m. A partir dos 55 probandos, foram acessados mais 2551 familiares, totalizando 2606 indivíduos presentes em todos os heredogramas.

**TABELA I:** Malformações genéticas ou síndromes nas quais o prognatismo mandibular é apresentado como uma das características clínicas.

<b>Malformações genéticas ou síndromes</b>	<b>Principais Características fenotípicas</b>
Síndrome de <i>Momes</i>	Retardo mental, obesidade, hipoplasia maxilar, prognatismo mandibular, dermatite crônica, alterações nos olhos e nas pálpebras.
Geroderma osteodisplásico ( <i>Walt Disney dwarfism</i> )	Pele com envelhecimento precoce, osteoporose, testa larga, hipotelorismo, hipoplasia malar e prognatismo mandibular, nariz e orelhas proeminentes.
Síndrome de <i>Gorlin</i>	Hidrocefalia, displasia vertebral, prognatismo mandibular, escoliose torácica congênita, marcas nas palmas das mãos e sola dos pés, alterações nas vértebras e costelas, <i>nevus</i> de células basais.
Osteopetrose	<i>Genu valgum</i> , prognatismo mandibular, anemia, hepatoesplenomegalia, retenção prolongada de dentes decíduos, malformação de coroas dentárias.
Síndrome de <i>Crouzon</i>	Craniosinostose, hipertelorismo, exoftalmia, estrabismo, nariz proeminente, hipoplasia de maxila e terço médio de face, prognatismo mandibular.
Síndrome Miastênica	Hipotonia muscular, fadiga excessiva, ptose palpebral, palato estreito e ogival, prognatismo mandibular.
Síndrome do retardamento mental (tipo belga)	Retardo mental moderado, nariz largo, olhos afundados, prognatismo mandibular, epilepsia hipogonadismo hipergonadotrófico, hábitos eunucóides.
Anquilose dental	Anquiloses dentais, clinodactilia, mordidas abertas posteriores, altura facial diminuída, mandíbula proeminente.

<b>Malformações genéticas ou síndromes</b>	<b>Principais Características fenotípicas</b>
Síndrome de <i>Sotos</i>	Crescimento rápido e excessivo, acromegalia, retardamento mental, gigantismo cerebral, crânio aumentado e prognatismo mandibular.
Mucopolidose	<i>Nevus</i> , pouca mobilidade nas articulações, testa proeminente, nariz largo, macroglossia, prognatismo mandibular.
Síndrome de <i>Waardenburg</i>	Surdez, nariz largo, deficiência de pigmentação, distância intercantal aumentada, prognatismo mandibular.
Disostose Maxilo-facial	Hipoplasia de maxila, fissuras palpebrais, atraso na fala e fala não fluente, prognatismo mandibular.
Síndrome de <i>Pfeiffer</i>	Alterações nos dedos das mãos e dos pés, acrocefalia, polisindactilia, hipoplasia de terço médio de face, surdez, prognatismo mandibular, escoliose severa.
Síndrome de <i>Apert</i>	Craniosinostose, hipoplasia de terço médio de face, sindactilia, prognatismo mandibular, fusão de vértebras cervicais, deficiência mental.
Síndrome Bráquio-esqueleto-genital	Retardo mental, hipoplasia de maxila, prognatismo mandibular, cistos odontogênicos, nariz largo, hipertelorismo.
Defeito acro-renal	Diabetes, prognatismo mandibular, nariz peculiar, alterações nos dedos, alterações nos rins e uretra.
Síndrome de <i>Verloes-Koulisher</i>	Ausência da pré-maxila e anodontia de incisivos e caninos superiores, defeitos nas mãos e dedos, prognatismo mandibular relativo.
Esclerosteose (SOST)	Sindactilia, perda de audição, paralisia do nervo facial, estrabismo, exoftalmia, excessivo crescimento mandibular.
Síndrome do X frágil	Retardo mental, orelhas largas, mandíbula proeminente, dificuldade de fala, macrocefalia.



<b>Malformações genéticas ou síndromes</b>	<b>Principais Características fenotípicas</b>
Síndrome de <i>Scheie</i>	Retardo mental, rigidez articular, malformações cardíacas, prognatismo mandibular, nariz largo e pescoço curto.
Hipospadias, coloboma de pálpebra superior e perda auditiva do tipo misto Retardamento mental ligado ao X	Hipertelorismo, fenda nasal, lábios proeminentes, filtro de lábio espesso, hipoplasia de maxila e prognatismo mandibular, perdas auditivas. Retardamento mental, microcefalia, baixa estatura, fissuras palpebrais, malformações cardíacas, hipoplasia de malar e prognatismo mandibular.
Síndrome de <i>Weaver</i>	Crescimento ósseo acelerado, atraso psicomotor, hérnias, hipotonia muscular, pele flácida, prognatismo mandibular, orelhas largas.
Osteogênese imperfeita Tipo 1	Fraturas ósseas múltiplas, hiper mobilidade nas articulações, prolapso da válvula mitral, perdas auditivas, prognatismo mandibular, miastenia grave.
Braquimetapoidia, hipotricose	Anodontias congênitas, hipoplasia de maxila dando a idéia de prognatismo mandibular, baixa estatura, alterações nos dedos, poucos cabelos, albinoidismo, miopia severa.
Síndrome de <i>Rieger</i>	Hipodontia ou anodontia, hipoplasia de maxila, falso prognatismo mandibular, hérnias umbilicais, alterações oftalmológicas.
Displasia cleido-craniana	Hipoplasia de clavículas, malformação crânio, alterações nos dedos, displasia mandibular.

## **Avaliação do fenótipo**

As histórias familiares completas de cada probando foram averiguadas e o *status* de cada um de seus parentes presentes no heredograma foi acessado. A presença de prognatismo mandibular nos afetados foi confirmada pela avaliação dos seguintes registros ortodônticos: telerradiografia com traçado e análise cefalométrica, modelos de estudo ortodônticos e/ou fotografias intrabucais e faciais, seguindo-se os mesmos critérios utilizados para a seleção e avaliação dos probandos.

Os casos no qual o *status* de afetado não pôde ser comprovado adequadamente foram assinalados nos heredogramas como desconhecidos. Os indivíduos que haviam sido submetidos anteriormente a algum tratamento ortodôntico tiveram os registros de sua documentação ortodôntica solicitados aos profissionais responsáveis pelos tratamentos. Nos casos em que o registro não existia mais ou nunca tivessem sido feitos, os indivíduos foram examinados clinicamente e seus registros cefalométricos e fotográficos foram obtidos. Nos casos de indivíduos que haviam sido submetidos a cirurgias ortognáticas para a correção do prognatismo mandibular, foram considerados tanto os registros pré-operatórios como os pós-operatórios.

As crianças abaixo de 15 anos de idade, não afetadas, mas sob suspeita de virem a desenvolver o prognatismo mandibular mais tarde (presença de parentes afetados), e que não tinham ainda atingido a puberdade na época do exame, também foram classificadas como de fenótipo desconhecido. Esse procedimento foi decorrente do conhecimento do aparecimento tardio do problema em alguns indivíduos, mais precisamente durante o surto de crescimento da puberdade (El-Gheriani, 2003; Litton *et al.*, 1970).

A documentação considerada como mais importante na análise dos indivíduos foi a telerradiografia cefalométrica (FIGURA 1). Os pacientes foram diagnosticados como portadores de prognatismo mandibular se tivessem um ângulo ANB (posição da maxila em relação à mandíbula) negativo quando avaliados em posição de relação cêntrica. O ângulo do plano mandibular (SNGoGn) também foi levado em consideração, pois um valor muito elevado do ângulo pode sugerir um padrão de crescimento facial predominantemente vertical e um ângulo menor está relacionado a um padrão de crescimento mandibular predominantemente horizontal. O comprimento total da mandíbula foi medido através da distância Go-Gn (Gônio-Gnátio) e a forma mandibular através do ângulo goníaco. Os pacientes diagnosticados como portadores de

severa deficiência de crescimento maxilar, avaliados cefalometricamente pela media ENA-Po (Espinha nasal anterior- Póron), porém com mandíbulas normais foram excluídos da amostra.

As características faciais foram avaliadas através de fotografias de perfil. Os indivíduos selecionados foram os com perfil facial côncavo e prognatismo mandibular, sendo que maxila e terço médio de face apresentavam um padrão de crescimento e desenvolvimento próximo da normalidade (FIGURA 2).

A presença de molares e caninos em relação de classe III de Angle (levando em consideração as perdas de espaço, perdas dentárias, apinhamentos e mal posicionamento dentário), a presença de mordidas cruzadas ou mordidas de topo anterior foram determinadas por exame clínico, análise dos modelos de estudo ortodônticos articulados em relação cêntrica e/ou através de fotografias intra-bucais (FIGURAS 3 e 4).

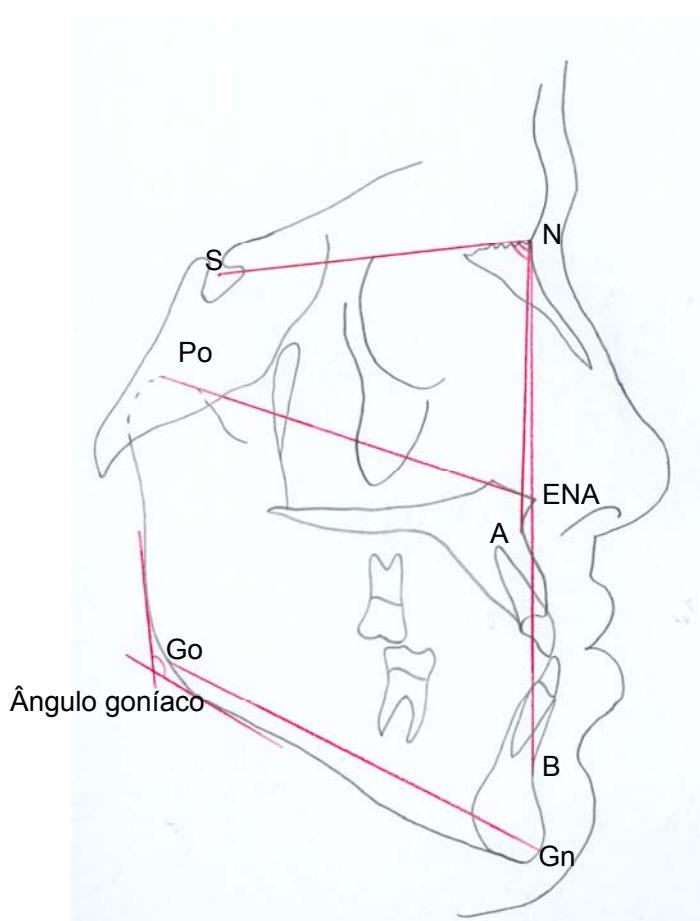


FIGURA 1 - Traçado cefalométrico lateral de um paciente da amostra de prognatismo mandibular, mostrando as medidas angulares e lineares utilizadas.



FIGURA 2 – Fotografias faciais de perfil e de frente de um paciente da amostra, evidenciando o perfil facial côncavo devido ao prognatismo mandibular.



FIGURA 3 – Fotografia intrabucal com vista frontal de um paciente da amostra evidenciando a mordida de topo anterior em função do prognatismo mandibular.



FIGURA 4 – Fotografias intrabucais com vistas laterais esquerda e direita de um paciente da amostra evidenciando a chave de oclusão de caninos e primeiros molares de classe III de Angle em função do prognatismo mandibular.

## Obtenção dos heredogramas

Todos os heredogramas foram desenhados utilizando-se o software PELICAN 1.1.0 - (*Pedigree Editor for Linkage Computer Analysis*) (Dudbridge *et al.*, 2004), que é uma ferramenta para edição gráfica de dados. Símbolos convencionais de heredogramas foram utilizados. Indivíduos cujo fenótipo não pôde ser comprovado foram representados por um ponto de interrogação no meio da figura.

A pesquisa nas famílias, após a identificação dos probandos foi realizada buscando a maior abrangência (número de parentes acessados) e de maneira sistemática. Regras de averiguação no que se refere à maneira pelas quais as informações para a geração dos heredogramas foram obtidas foram seguidas durante a entrevista com os probandos e seus familiares. Perguntas como: “Quem tem prognatismo na família?” não foram realizadas por se considerar que poderiam levar a resultados tendenciosos.

O levantamento inicial para o desenho do heredograma foi feito independente do *status* fenotípico dos membros da família. Dessa forma, a mesma pergunta foi feita com relação aos dois lados da família. Por exemplo, quando se perguntou a respeito dos primos e avós do lado materno da família, a mesma pergunta foi realizada para o lado paterno, independentemente da verificação prévia do lado da família em que estava ocorrendo a segregação do prognatismo mandibular. Desta maneira os heredogramas foram estendidos de forma simétrica para ambos os lados. Finalmente, de posse dos heredogramas, questionava-se o *status* de cada um dos indivíduos da família com relação ao prognatismo mandibular, um a um, para ambos os lados, paterno e materno. Os fenótipos de todos os indivíduos acessados foram incluídos no heredograma independentes do ramo em questão parecer negativo (sem membros afetados).

## Avaliação dos heredogramas

Os heredogramas foram usados para se calcular a incidência do prognatismo mandibular, a distribuição dos afetados (probandos e parentes) em relação ao gênero e para estimar o modelo genético que melhor explicaria a segregação nas famílias avaliadas. No que se refere ao padrão familiar, os heredogramas foram avaliados em busca de indicativos de região genômica e de dominância/recessividade. Para tanto, foram estimados os números de casos em que ambos os genitores dos probandos eram afetados e aqueles nos quais apenas um genitor era afetado e qual o gênero do mesmo

(se o pai ou mãe). A mesma avaliação foi buscada também com relação aos avós e, por isso, foi necessário coletar dados de no mínimo três gerações.

### **Análise estatística**

Para as análises estatísticas partes de alguns heredogramas foram excluídos visando ter apenas um fundador por heredograma, de modo que o N total de 2606 indivíduos foi diminuído para 2050.

Três tipos de correlação familiar foram avaliados - pais-mães, pais-filhos e mães-filhos. Foram utilizados 484 pares de pais-mães, 1410 pares de mães-filhos e 1402 pares de pais-filhos. A herdabilidade ( $h^2$ ) foi estimada como a soma das correlações mães-filhos e pais-filhos (Gass *et al.*, 2003), e a correlação mães-pais serviu para avaliar se havia casamento preferencial ou não entre dois indivíduos afetados.

Para estimar se havia correlação entre o sexo do indivíduo e o *status* fenotípico, os indivíduos afetados e não-afetados dos sexos masculino e feminino foram comparados. Nessa análise o número total de casos processados foi de 2045, pois dos 2050 indivíduos que passaram a compor o N total da amostra após o corte nos heredogramas, cinco apresentavam gênero e fenótipo desconhecido.

Para se estimar se a informação sobre o *status* fenotípico de indivíduos falecidos apresentava confiança, foram comparados os indivíduos afetados e não-afetados vivos e falecidos. Para essas comparações foi utilizado o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson, sendo que o número de graus de liberdade (g.l.) nas diversas tabelas foi estimado por  $g.l. = (\text{número de linhas} - 1) \times (\text{número de colunas} - 1)$ . Para efetuar todas essas análises, foi utilizado o programa SPSS versão 13.0 (*Statistical Package of Social Science* – SPSS Inc.).

### **Análise complexa de segregação**

Os dados extraídos dos heredogramas foram compilados em planilhas EXCEL (Microsoft), necessárias para alimentar o programa POINTER, que conduziu a análise complexa de segregação usando o modelo misto unificado (Lidral e Reising, 2002; Borecki *et al.*, 1994; Morton *et al.*, 1983; Lalouel e Morton, 1981).

O modelo misto unificado compara a adequação estatística de diversos modelos genéticos alternativos, envolvendo um conjunto de fatores transmitidos dentro das famílias, dentre eles os genes principais e os componentes multifatoriais. A análise

permitiu também estimar os valores de máxima verossimilhança e os limites de confiança para os diversos parâmetros dos modelos alternativos. Essencialmente, os parâmetros são estimados baseados no modelo que melhor se adapta aos dados observados. Os parâmetros avaliados foram: o deslocamento dos indivíduos Aa com relação aos indivíduos AA e aa, a dedução da penetrância e da frequência alélica do(s) gene(s) principal (is), a herdabilidade do componente poligênico quando da sua existência, a distribuição do genótipo na população (para um gene mendeliano principal, uma função da frequência alélica) e as probabilidades de transmissão dentro das famílias. Uma vez que os genótipos eram desconhecidos, todas as possíveis combinações de genótipos compatíveis com os dados observados e com as leis de Mendel foram computadas.

Todos os modelos alternativos foram comparados ao modelo mendeliano misto. Esse modelo assume que o fenótipo é composto de uma escala de predisposição subjacente, para a qual poderiam ter contribuído, de modo independente, um *locus* autossômico principal, um componente multifatorial e fatores aleatórios do ambiente. No *locus* autossômico principal supõe-se um par de alelos A/a cujas frequências são representadas respectivamente por p e q, sendo que  $p+q = 1$ , e com os genótipos AA, Aa e aa resultantes, os quais se distribuem na população segundo o teorema de Hardy e Weinberg (Lalouel *et al.*, 1983; Morton *et al.*, 1983; Lalouel *et al.*, 1981). Existem quatro parâmetros neste modelo:

- 1) a posição da média do genótipo heterozigoto (Aa) em relação às médias dos homozigotos é designada por *grau de dominância* e representada por (d). No caso de um dos fenótipos em estudo ser completamente dominante ( $AA = Aa$ ), d será igual a 1 e, em havendo co-dominância, d será igual a 0,5. Se a dominância for parcial ter-se-á  $0,5 < d < 1$ .
- 2) A distância entre as médias dos dois genótipos homozigotos (AA e aa) é denominada *deslocamento* e representada por (t). É um parâmetro teórico usado no cálculo da dominância.
- 3) A frequência alélica do gene principal (q).
- 4) um parâmetro representando a herdabilidade multifatorial (H) que reflete a transmissão poligênica (influência de outros genes diferentes do gene principal).

Parâmetros adicionais foram estimados para testar desvios da transmissão mendeliana do efeito principal de pais aos filhos. Esses parâmetros, indicados por  $\tau_{AA}$ ,  $\tau_{Aa}$  e  $\tau_{aa}$  indicam, respectivamente, as probabilidades de os genótipos AA, Aa e aa

transmitirem o alelo A. Nas transmissões mendelianas  $\tau_{AA} = 1$ ,  $\tau_{Aa} = 1/2$ ,  $\tau_{aa} = 0$ , transmissões não-mendelianas têm  $\tau_s$  diferentes desses valores e nenhuma transmissão do gene principal é obtida quando os três  $\tau_s$  são iguais ( $\tau_{AA} = \tau_{Aa} = \tau_{aa}$ ).

Foram testadas diferentes hipóteses por fixação ou estimativa de parâmetros do modelo completo. Os testes das hipóteses para modelos relacionados foram realizados utilizando o teste da razão da verossimilhança, onde a diferença do  $-2\ln L$  (menos duas vezes o logaritmo neperiano da verossimilhança) de dois modelos alternativos é distribuído como  $\chi^2$  com graus de liberdade igual à diferença do número de parâmetros independentes. Para modelos não relacionados, foi usado o AIC (*Akaike's information criterion*) que é calculado como menos duas vezes a verossimilhança do modelo mais duas vezes o número de parâmetros estimados. O modelo com o menor AIC indica o modelo mais adequado para os dados observados (Lalouel *et al.*, 1983; Morton *et al.*, 1983; Lalouel *et al.*, 1981).

No modelo misto, apenas os parâmetros, indicados por  $\tau_{AA}$ ,  $\tau_{Aa}$  e  $\tau_{aa}$  foram fixados, respectivamente em 1,  $1/2$  e 0. Todos os demais parâmetros foram deixados livres para serem estimados pelo programa.

No modelo aleatório, que assume que o fenótipo ocorre ao acaso na população estudada, ou seja, sem a presença de um gene principal ou de componentes multifatoriais, os valores de d, t, q e H foram fixados em [0].

O modelo denominado “sem gene principal” tenta explicar o fenótipo somente pela presença de um componente multifatorial. Nesse modelo, os parâmetros de d, t e q foram fixados em [0]. O parâmetro herdabilidade multifatorial (H) foi estimado, testando-se mil valores diferentes entre 0 e 1 espaçados de 0,001 em 0,001 pontos, a fim de saber qual valor seria mais adequado, ou em outras palavras qual seria a participação de outros genes secundários sem que houvesse um gene principal.

Para o modelo sem componente multifatorial, que assume que a distribuição familiar do fenótipo se deve unicamente à presença de um gene principal, o valor de H foi fixado em [0] e os valores de  $\tau_{AA}$ ,  $\tau_{Aa}$  e  $\tau_{aa}$  fixados respectivamente em [1], [0,5] e [0]. Os parâmetros d, t e q ficaram livres para serem estimados.

Também foram testados os modelos estritamente recessivo, aditivo e estritamente dominante, onde os valores de d foram fixados respectivamente em [0], [0,5] e [1] e os valores de  $\tau_{AA}$ ,  $\tau_{Aa}$  e  $\tau_{aa}$  em [1], [0,5] e [0], de acordo com a



probabilidade dos referidos genótipos transmitirem o alelo A. Os valores de t e q foram estimados.

O modelo denominado “ $\tau$ s livre” comparou os valores encontrados para  $\tau_{AA}$ ,  $\tau_{Aa}$  e  $\tau_{aa}$  com os valores esperados 1,  $\frac{1}{2}$  e 0, encontrados em casos de padrão de herança mendeliana. Neste modelo o H foi fixado em [0] e os outros seis parâmetros foram estimados.

O modelo “ $\tau$ s iguais” testa a hipótese de influência ambiental importante. Nesse caso, quando os valores de *taus* ( $\tau$ ) tendem a ficar iguais, a agregação familiar estudada não é mais considerada genética, uma vez que não há transmissão do gene principal.

Foram feitas duas análises: 1. utilizando a amostra total, fracionada em núcleos familiares (pais e filhos); 2. usando um subconjunto da amostra, considerando apenas as famílias nucleares (pais, mães e filhos), onde um dos indivíduos era o probando. Nesta segunda análise acrescentou-se um dado ao programa: a incidência do prognatismo mandibular na população brasileira, estimada em 2%.

## **IV-Resultados**

### **Avaliação dos heredogramas**

Os heredogramas das 55 famílias foram construídos a partir das informações coletadas nas entrevistas com os probandos. Informações relativas a ambos os lados da família, paterno e materno, foram incluídos independente do lado no qual o fenótipo estava segregando. Os 55 heredogramas obtidos encontram-se no ANEXO 2. Na TABELA II está apresentada a distribuição dos indivíduos afetados e não afetados e a sugestão do modelo genético pela análise visual dos heredogramas para cada família avaliada a partir de probandos afetados com prognatismo mandibular. Um resumo desses dados quanto ao número de indivíduos de acordo com o fenótipo e o gênero encontra-se na TABELA III. O total de indivíduos acessados foi de 2606 e a incidência do prognatismo mandibular nessas famílias foi estimado em 14,3%.

Os resultados sugerem haver um componente hereditário para a expressão do prognatismo mandibular. O padrão familiar observado visualmente nos 55 heredogramas sugere a predominância de um modelo autossômico dominante (TABELA II). Os resultados indicaram que 50 famílias (91%) mostraram um padrão autossômico dominante (FIGURA 5), sendo 33 famílias com penetrância incompleta e 17 com penetrância completa.

Em quatro famílias, representando 7,2% da amostra, o prognatismo mandibular foi um caso esporádico, o que poderia sugerir um modelo autossômico recessivo, uma mutação dominante nova ou mesmo fenocópias. Dessas quatro famílias, três apresentaram uma situação característica na qual somente o probando era afetado (FIGURA 6). Em uma das famílias foram observados dois indivíduos afetados (FIGURA 7). Em duas famílias, representando 1,8% da amostra, ambos os padrões de herança foram encontrados, dominante e recessivo, indicando, provavelmente, a segregação de dois ou mais diferentes genes ou grupos de genes na mesma família (FIGURA 8).

**TABELA II** – Distribuição dos indivíduos afetados e não afetados, de acordo com o gênero e modelo genético sugerido, observada em 55 famílias brasileiras avaliadas a partir de probandos com prognatismo mandibular.

Família	Modelo	Probando	Parentes afetados		Parentes não afetados		Fenótipo desconhecido		Gênero/fenótipo desconhecido	Total
			Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino		
1	AD	F	1	4	4	1	-	-	-	11
2	AD	F	2	4	14	16	-	-	-	37
3	AD/AR*	M	3	3	13	14	2	2	-	38
4	AD*	F	3	3	13	16	-	-	-	36
5	AD	M	-	8	19	5	-	2	-	35
6	AD*	F	2	2	14	19	-	-	-	38
7	AD*	M	4	1	20	23	-	-	-	49
8	AD*	F	3	1	13	15	-	-	-	33
9	AD*	F	2	1	21	23	-	-	-	48
10	AD	F	-	2	21	14	1	-	-	39
11	AD*	F	3	12	9	-	-	-	-	25
12	AD	M	-	3	6	4	1	1	-	16
13	AR*	F	-	-	13	9	-	-	-	23
14	AD*	F	-	4	43	35	-	-	-	83
15	AD	F	7	3	12	19	-	-	-	42
16	AD*	M	1	1	25	24	-	-	-	52
17	AD	F	3	2	19	27	-	-	-	52
18	AD*	M	3	1	5	6	-	-	-	16

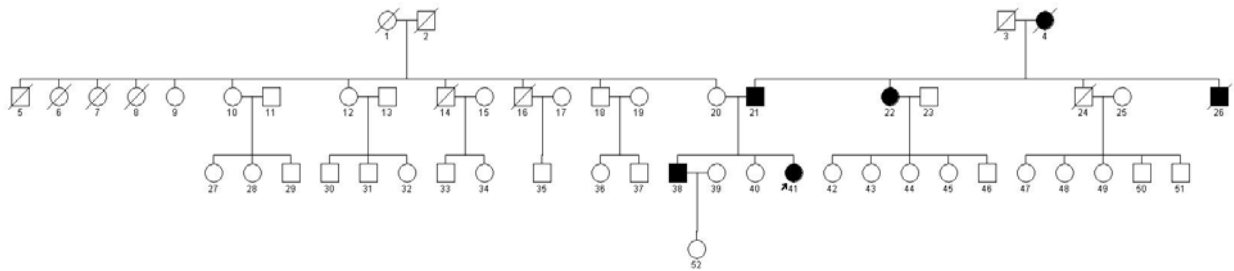
Família	Modelo	Probando	Parentes afetados		Parentes não afetados		Fenótipo desconhecido		Gênero/fenótipo desconhecido	Total
			Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino		
19	AD*	M	3	-	6	11	-	-	-	21
20	AD	M	6	3	20	13	-	-	-	43
21	AD*	M	2	5	19	13	-	-	-	40
22	AD*	F	4	4	29	40	1	2	-	81
23	AD*	F	4	-	14	14	-	-	-	33
24	AD*	F	2	3	10	8	-	-	-	24
25	AD	F	9	3	31	28	-	-	-	72
26	AR	F	-	1	28	31	-	-	1	62
27	AD*	F	10	6	28	35	3	1	-	84
28	AD*	M	1	1	14	12	-	-	-	29
29	AD*	F	-	1	43	35	1	1	-	82
30	AD*	F	2	3	29	36	2	1	-	74
31	AD	F	6	1	18	25	4	2	-	57
32	AD*	F	1	4	31	29	-	-	-	66
33	AD*	F	3	9	34	34	-	-	-	81
34	AD*	F	1	2	21	21	3	1	-	50
35	AD	M	5	4	17	10	-	-	-	37
36	AD*	M	3	4	15	14	-	-	-	37
37	AD	M	2	4	26	16	1	-	-	50
38	AD*	F	1	-	16	10	-	-	-	28

Família	Modelo	Probando	Parentes afetados		Parentes não afetados		Fenótipo desconhecido		Gênero/fenótipo desconhecido	Total
			Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino		
39	AD*	M	-	5	16	15	2	2	5	46
40	AD*	F	2	3	22	19	2	5	-	54
41	AR*	F	-	-	15	20	-	1	-	37
42	AD	F	-	4	15	14	-	-	-	34
43	AD*	F	4	9	38	36	1	1	-	90
44	AD*	F	1	3	22	31	3	1	-	62
45	AD*	F	1	1	20	17	-	1	-	41
46	AD	M	1	3	12	9	-	-	-	26
47	AD*	F	3	6	17	15	-	-	-	42
48	AD*	F	5	4	18	24	-	-	-	52
49	AD*	F	2	3	17	17	-	-	35	75
50	AR*	M	-	-	28	17	-	-	-	46
51	AD	M	2	2	16	13	1	2	-	37
52	AD	F	3	2	15	19	-	-	-	40
53	AD*	F	3	3	35	34	3	3	-	82
54	AD	F	9	14	31	19	3	3	-	80
55	AD*	M	2	2	5	13	8	4	3	38
Total			140	177	1075	1037	42	36	44	2606

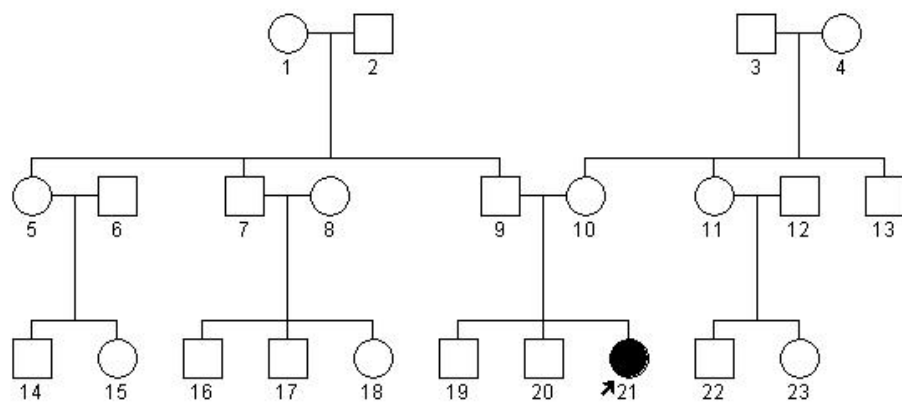
Nota: AD – autossômico dominante com penetrância completa; AD\* – autossômico dominante com penetrância incompleta; AR\* – heredogramas onde somente o probando era afetado (autossômico recessivo ou nova mutação).

**TABELA III** - Número de indivíduos de acordo com o fenótipo e o gênero em 55 famílias brasileiras, avaliadas a partir de probandos afetados com prognatismo mandibular.

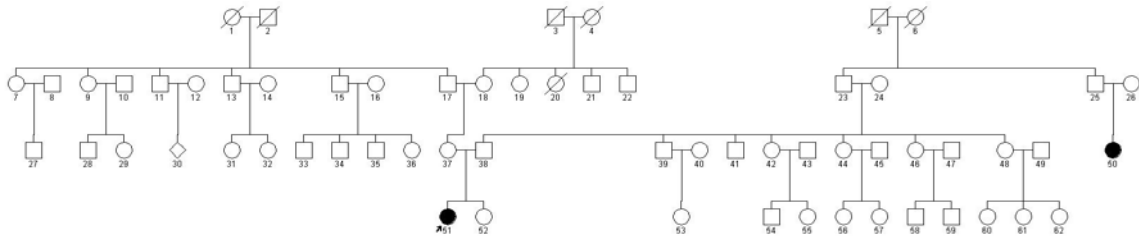
Fenótipo \ Gênero	Afetados				Não afetados	Desconhecido	Total			
	Probandos		Parentes							
<b>Masculino</b>	18	32,7%	140	44,2%	1075	50,9%	42	34,4%	1275	48,9%
<b>Feminino</b>	37	67,3%	177	55,8%	1037	49,1%	36	29,5%	1287	49,4%
<b>Desconhecido</b>	-	-	-	-	-	-	44	36,1%	44	1,7%
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>100,0%</b>	<b>317</b>	<b>100,0%</b>	<b>2112</b>	<b>100,0%</b>	<b>122</b>	<b>100,0%</b>	<b>2606</b>	<b>100,0%</b>



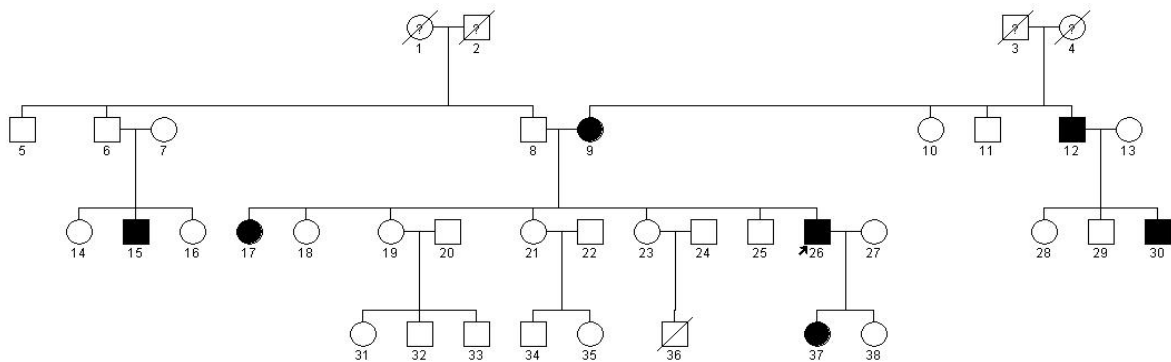
**FIGURA 5** – Heredograma mostrando um padrão de herança autossômico dominante com penetrância completa (Família 17).



**FIGURA 6** - Heredograma mostrando um caso esporádico de prognatismo mandibular, que poderia ser uma herança autossômica recessiva, uma nova mutação dominante ou uma fenocópia (Família 13).



**FIGURA 7** – Heredograma mostrando dois casos esporádicos de prognatismo mandibular em uma mesma família, que poderiam representar um padrão de herança autossômico recessivo ou a presença de mutações dominantes novas ou fenocópias (família 26).



**FIGURA 8** – Heredograma mostrando dois padrões distintos de herança. O lado direito do heredograma mostra uma herança autossômica dominante. O indivíduo 15 não pertence a esta família e seu *status* de afetado provavelmente seja devido a um gene diferente com características recessivas, a uma nova mutação ou mesmo seja uma fenocópia (família 3).

Dentre os 372 indivíduos com prognatismo mandibular (probandos e familiares) observados, 158 eram do sexo masculino e 214 do feminino. Considerando apenas os probandos, 18 são do sexo masculino e 37 do feminino. A relação sexo masculino/sexo feminino na amostra como um todo foi de 1:1,35. A avaliação quanto a distribuição de afetados/não afetados entre os dois sexos foi estatisticamente significativa quando considerou-se o N total de 2045 (cinco casos do total de 2050 indivíduos que restaram após o corte de parte dos heredogramas apresentavam gênero e fenótipo desconhecido) (TABELA IV) e não significativo quando exclui-se os probandos da análise ( $\chi^2 = 4,153$ ; GL = 2;  $p = 0,125$ ).

A TABELA V mostra a prevalência do prognatismo mandibular entre os irmãos, pais e avôs de probandos. Para 28 dos 55 probandos (51%), um dos pais também era afetado (exatamente 14 mães e 14 pais) e em uma única família (família 54) ambos os pais eram afetados. Em 25 famílias de um total de 51 (50%) nas quais informações de no mínimo duas gerações acima dos probandos estavam disponíveis, um dos quatro avôs também era afetado, e em um heredograma, um bisavô era afetado e nenhum dos avôs era afetado. Esses percentuais de prevalência entre pais e avôs apóiam a idéia do padrão autossômico dominante com penetrância incompleta, pois era esperado que 100% dos probandos apresentassem pelo menos um dos pais afetados se a herança para todas as famílias fosse autossômica dominante com penetrância completa, mas somente 53% dos probandos encontravam-se nessa situação. A análise dos irmãos dos 55 probandos revelou um equilíbrio na prevalência do prognatismo mandibular entre os indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino: 21 irmãos afetados em um total de 64 irmãos (32,9%) vs. 16 irmãs afetadas em um total de 58 irmãs (27,6%).

Considerando o conjunto dos dados e não apenas os probandos, o número de filhos afetados nascidos de um casal onde um dos pais era afetado (96 mães e 77 pais) e o outro era não afetado, foram observados 206 filhos afetados, 367 não afetados e 25 crianças (não afetadas, mas abaixo de 15 anos). A taxa de 206:367 (1: 1,78) é na verdade quase a metade da taxa de 1:1 esperada em um padrão autossômico dominante típico, considerando o casamento entre um heterozigoto e um homozigoto recessivo para a característica. Quando se incluem os filhos mais novos, a indicação de penetrância incompleta se mantém, tanto considerando esses indivíduos como sendo afetados (231 afetados: 367 não afetados ou 1: 1,58) como não sendo afetados (206 afetados:392 não afetados ou 1:1,90).

De acordo com os resultados obtidos quanto a distribuição observada dos indivíduos vivos e falecidos de acordo com o *status* fenotípico (TABELA VI), as informações fornecidas a respeito dos de parentes já falecidos podem merecer confiança, pois não houve diferença estatisticamente significativa entre o observado e o esperado. Para essa análise, foi considerado o N total de 2050 indivíduos, sem excluir os cinco casos de gênero e fenótipo desconhecido.

As análises de correlação familiar estão apresentadas na TABELA VII. A estimativa da herdabilidade ( $h^2$ ) do prognatismo mandibular nas famílias analisadas foi de 0,316 com um desvio-padrão de 0,059, que representa a soma das correlações e dos desvios-padrões de mães-filhos e pais-filhos (Gass *et al.*, 2003; Mauchamp, 1979).



**TABELA IV** – Distribuição observada e esperada dos 2045 indivíduos de acordo com o fenótipo e o gênero nas 55 famílias brasileiras após a exclusão de partes dos heredogramas e dos cinco casos com gênero e fenótipo desconhecidos.

Fenótipo \ Gênero	Afetados		Não afetados		Desconhecido		Total	
	Obs	Esp	Obs	Esp	Obs	Esp	Obs	Esp
Masculino	152	174,6	811	790,1	40	38,3	1003	1003,0
Feminino	204	181,4	800	820,9	38	39,7	1042	1042,0
<b>Total</b>	<b>356</b>	<b>356,0</b>	<b>1611</b>	<b>1611,0</b>	<b>78</b>	<b>78,0</b>	<b>2045</b>	<b>2045,0</b>

$\chi^2 = 6,981$  (GL = 2); p = 0,030

**TABELA V** - Prevalência do prognatismo mandibular entre os irmãos e pais dos 55 probandos e os avôs de 52 probandos, sugerindo a existência de um padrão de herança autossômica dominante e penetrância incompleta.

Pais afetados			Avôs afetados			Irmãos			
						Masculino		Feminino	
Mães	Pais	Ambos	Avós	Avôs	Mais de um	Afetado	Não afetado	Afetado	Não afetado
14	14	2	12	11	2	21	43	16	42
30			25			64		58	

**TABELA VI** Distribuição observada e esperada para os 2050 indivíduos de acordo com o fenótipo e a condição de vivo ou falecido nas 55 famílias brasileiras, incluindo os cinco casos com gênero e fenótipo desconhecido.

Fenótipo \ Vivos	Afetados		Não afetados		Desconhecido		Total	
	Obs	Esp	Obs	Esp	Obs	Esp	Obs	Esp
Vivos	300	312,8	1430	1415,3	71	72,9	1801	1801,0
Falecidos	56	43,2	181	195,7	12	10,1	249	249,0
<b>Total</b>	<b>356</b>	<b>356,0</b>	<b>1611</b>	<b>1611,0</b>	<b>83</b>	<b>83,0</b>	<b>2050</b>	<b>2050,0</b>

$\chi^2 = 5,954$  (GL = 2); p = 0,051

**TABELA VII** – Correlações familiares entre mães-pais, mães-filhos e pais-filhos nas 55 famílias analisadas, com relação à presença do prognatismo mandibular.

Relacionamento	Número de pares	Correlação	Desvio padrão
Mães-pais	484	-0,201	0,030
Mães-filhos	1410	0,170	0,030
Pais-filhos	1402	0,146	0,029

## Análise complexa de segregação

Os resultados encontrados quanto a análise complexa de segregação considerando a amostra total pode ser vista na TABELA VIII. De acordo com a análise, no modelo misto os valores de  $d$  e  $H$  atingiram seus limites, respectivamente um e zero. Isto significa que, na tentativa de estimar os parâmetros, a melhor solução em termos de resolução do algoritmo teve valor maior do que o possível, no caso de  $d$ , e menor que o possível, no caso de  $H$ , dado o modelo biológico. Por exemplo, 1,1 para  $d$  e -0,01 para  $H$ . Quando isso acontece, automaticamente o programa converge os valores para o limite de cada um deles.

Comparado ao modelo misto, os modelos denominados de “aleatório”, “sem gene principal” e “ $\tau$ s iguais” não convergiram, isto é, não se adequaram ao padrão dos heredogramas. Dessa forma, as hipóteses de inexistência de associação familiar e de influência ambiental importante devem ser rejeitadas. Por outro lado, os dados indicam que não é possível explicar a segregação do fenótipo sem a presença de um gene principal e de um componente multifatorial.

As hipóteses de ausência de componente multifatorial ( $p=0,0104$ ), de padrões de herança mendeliana estritamente recessiva ( $p=0,0000$ ), aditiva ( $p=0,0002$ ) e estritamente dominante ( $p=0,0000$ ) foram rejeitadas. O modelo com “ $\tau$ s livre” não pôde ser rejeitado ( $p=0,4710$ ), o que demonstra a existência de um padrão de herança mendeliana com características dominantes ( $d=1$ ), pois os valores de  $\tau_{AA}$ ,  $\tau_{Aa}$  e  $\tau_{aa}$  estimados respectivamente em 1,01; 0,46 e -0,17 estão muito próximos dos valores esperados de 1, 1/2 e 0.

Os resultados obtidos na segunda análise de segregação, utilizando somente os núcleos familiares (pais-mães-filhos) onde um dos membros era o probando, e acrescentando a incidência do prognatismo mandibular na população brasileira como sendo de 2% estão apresentados na TABELA IX.

De acordo com os dados dessa segunda análise de segregação, tem-se que, em comparação com o modelo misto, podem ser rejeitados os modelos denominados de “aleatório” ( $p=0,0000$ ), “sem gene principal” ( $p=0,0400$ ), sem componente multifatorial ( $p=0,000$ ) e com herança mendeliana aditiva ( $p=0,0200$ ). O modelo que mais se adequou foi o modelo estritamente dominante ( $p=1,0000$ ), embora o modelo estritamente recessivo também não possa ser rejeitado ( $p=0,5700$ ).

**TABELA VIII.** Análise de segregação da ocorrência do prognatismo mandibular em famílias brasileiras (amostra total), onde foram feitas comparações de todos os modelos com o modelo mendeliano misto.

MODELO	d	t	q	H	$\tau_{AA}$	$\tau_{Aa}$	$\tau_{aa}$	-2lnL	$\chi^2$	P.E.	p	teste	AIC
<b>1. Mendeliano misto</b>	1,00*	1,80	0,10	0,00*	[1]	[0,5]	[0]	1397,50	-	4	-	-	1405,50
<b>2. Modelo Aleatório</b>	[0]	[0]	[0]	[0]	-	-	-	NC	-	-	-	-	-
<b>3. Sem gene principal</b>	[0]	[0]	[0]	-	[1]	[0,5]	[0]	NC	-	-	-	-	-
<b>4. Sem componente multifatorial</b>	0,74	1,92	0,21	[0]	[1]	[0,5]	[0]	1404,06	6,56	3	0,0104	4 vs 1	1410,06
<b>5. Mendeliano recessivo</b>	[0]	3,95	0,13	[0]	[1]	[0,5]	[0]	1525,18	127,68	2	0,0000	5 vs 1	1529,18
<b>6. Mendeliano aditivo (AA#Aa#aa)</b>	[0,5]	2,44	0,26	[0]	[1]	[0,5]	[0]	1414,32	16,83	2	0,0002	6 vs 1	1418,32
<b>7. Mendeliano dominante</b>	[1]	2,06	0,07	[0]	[1]	[0,5]	[0]	1430,24	32,74	2	0,0000	7 vs 1	1434,24
<b>8. <math>\tau</math>s livre</b>	1,00	1,65	0,13	[0]	1,01	0,46	-0,17	1395,99	1,51	6	0,4710	8 vs 1	1407,99
<b>9. <math>\tau</math>s iguais</b>	-	-	-	[0]	-	-	-	NC	-	-	-	9 vs 8	-

Os parâmetros colocados entre [ ] foram fixados no valor indicado.

\* parâmetro estimado atingiu o limite

d= grau de dominância do gene principal; t = deslocamento; q = frequência alélica do gene principal; H = herdabilidade multifatorial ;  $\tau_{AA}$ ,  $\tau_{Aa}$  e  $\tau_{aa}$  = probabilidades de transmissão do alelo A para os genótipos AA, Aa e aa..

-2lnL = índice de verossimilhança máxima;  $\chi^2$  = qui quadrado; P.E. = número de parâmetros estimados; p = significância; A.I.C. = usado para comparar modelos não relacionados;  $\tau$ s ou *Taus*= parâmetros de probabilidade de transmissão

**TABELA IX.** Análise de segregação da ocorrência do prognatismo mandibular em famílias brasileiras, considerando a incidência de 2% do prognatismo mandibular na população brasileira e considerando apenas famílias nucleares com probandos.

MODELO	d	t	q	H	$\tau_{AA}$	$\tau_{Aa}$	$\tau_{aa}$	-2lnL	$\chi^2$	P.E.	p	teste	AIC
1. Mendeliano misto	1,00*	2,70	0,06	0,20	[1]	[0,5]	[0]	95,89	-	4	-	-	103,89
2. Modelo Aleatório	[0]	[0]	[0]	[0]	-	-	-	244,58	148,69	0	0,00	2 vs 1	244,58
3. Sem gene principal	[0]	[0]	[0]	0,98	[1]	[0,5]	[0]	104,35	8,46	1	0,04	3 vs 1	106,35
4. Sem componente multifatorial	0,465	5,67	0,01	[0]	[1]	[0,5]	[0]	104,21	8,32	3	0,00	4 vs 1	110,21
5. Mendeliano recessivo	[0]	2,50	0,26	0,60	[1]	[0,5]	[0]	96,21	0,32	3	0,57	5 vs 1	102,21
6. Mendeliano aditivo (AA#Aa#aa)	[0,5]	2,70	0,29	0,20	[1]	[0,5]	[0]	98,72	5,49	3	0,02	6 vs 1	104,72
7. Mendeliano dominante	[1]	2,70	0,06	0,20	[1]	[0,5]	[0]	95,89	0,00	3	1,00	7 vs 1	101,89

Os parâmetros colocados entre [ ] foram fixados no valor indicado.

\* parâmetro estimado atingiu o limite

d= grau de dominância do gene principal; t = deslocamento; q = frequência alélica do gene principal; H = herdabilidade multifatorial ;  $\tau_{AA}$ ,  $\tau_{Aa}$  e  $\tau_{aa}$  = probabilidades de transmissão do alelo A para os genótipos AA, Aa e aa..

-2lnL = índice de verossimilhança máxima;  $\chi^2$  = qui quadrado; P.E. = número de parâmetros estimados; p = significância; A.I.C. = usado para comparar modelos não relacionados;  $\tau$ s ou *Taus*= parâmetros de probabilidade de transmissão.

## **V – Discussão**

### **Avaliação dos heredogramas**

A frequência do prognatismo mandibular no Brasil não foi muito pesquisada até a presente data. Porém, considerando que a população brasileira foi constituída predominantemente pela miscigenação de descendentes de europeus, africanos e ameríndios, sendo que este último é o grupo com menor representação, podemos estimar que a prevalência no país deva ser intermediária a dos seus fundadores. Dessa forma, partindo do conhecimento da prevalência em populações africanas sub-saarianas (3 a 8%) e européia (0,48 a 4%) (El-Gheriani *et al.*, 2003; Jorgensen, 1990; Garner *et al.*, 1985; Newman, 1965; Emrich *et al.* 1965; Davidov *et al.*, 1961), é possível inferir que a frequência dessa característica no Brasil deva ser próxima de 2%. De fato, os poucos trabalhos existentes mostram um percentual entre 1 e 3% (Martins *et al.*, 1994).

A frequência encontrada em nossa amostra foi muito maior (14,3%) do que a encontrada em qualquer das populações parentais (desconsiderando Ameríndios), o que reflete uma agregação familiar do prognatismo mandibular e sugere uma contribuição genética. Valor semelhante (11,2%) foi encontrado em 105 famílias japonesas coletadas a partir de probandos afetados, somando uma amostra de 1480 indivíduos (Watanabe *et al.*, 2005). Porém, esse valor foi bem inferior ao estimado considerando outras 243 famílias (1362 indivíduos), também do Japão, onde foi observado que quando o probando era portador de prognatismo mandibular, havia uma incidência significativamente mais alta dessa característica em outros membros da sua família (34,3%), quando comparado com famílias de indivíduos com oclusão normal (7,5%) (Suzuki, 1961).

Em relação à distribuição entre os sexos, o número de probandos e familiares afetados do sexo feminino foi maior que os do sexo masculino nas famílias avaliadas e essa diferença foi estatisticamente significativa. Porém, quando os probandos foram excluídos da análise a diferença não foi estatisticamente significativa. Muitas desordens ou distúrbios apresentam diferença de taxas de incidência entre os indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino. As razões para tais diferenças são múltiplas incluindo localização genômica do gene em questão (cromossomos X, cromossomo Y e DNA mitocondrial), diferenças hormonais, que estão particularmente sob controle genético, e

diferenças de desenvolvimento ou ambientais, como, por exemplo, as exposições ocupacionais e hábitos.

Desta maneira, exceto para doenças recessivas simples ligadas ao X, é difícil interpretar os efeitos do gênero especificamente à luz dos fatores genéticos e ambientais. No presente trabalho nenhuma das famílias apresentou características que remetesse a um padrão de herança uniparental ou ligado ao X. De fato, alguns autores acreditam que apesar do cromossomo X ter algum papel no prognatismo mandibular, a característica mendeliana não está ligada a ele (Thompson e Winter, 1988).

Associação entre a presença do fenótipo e o sexo dos indivíduos não foi confirmada por uma revisão dos dados da literatura a esse respeito (Litton *et al.* 1970). Por outro lado, uma maior prevalência do prognatismo mandibular entre os parentes do sexo masculino (11,9%) do que do sexo feminino (10,4%) foi encontrada na avaliação de três gerações de familiares de 105 pacientes japoneses que tinham sido submetidos a cirurgias ortognáticas para correção do prognatismo mandibular, sendo 45 probandos do sexo masculino e 60 do feminino (Watanabe *et al.*, 2005). Essa diferença de prevalência poderia ser decorrente de uma possível diferença na penetrância entre os dois sexos, sugerindo que a penetrância pudesse ser dependente do gênero, como foi proposto para algumas outras características, como para a puberdade precoce (Vries *et al.*, 2004).

Na análise de distribuição da característica entre os sexos deve-se levar em consideração que a amostra foi coletada a partir de probandos que haviam procurado tratamento ortodôntico ou cirúrgico para a correção do prognatismo mandibular (18 do sexo masculino e 37 do feminino). Isso pode explicar a diferença de significância nas duas análises realizadas. Sabe-se que um maior número de mulheres adultas procura esse tipo de tratamento quando comparado ao número de homens adultos (Yang, 1990), e essa deve ter sido a razão de uma maior quantidade de pessoas do sexo feminino entre os probandos. As mulheres procuram ter seus problemas orto-cirúrgicos avaliados duas vezes mais frequentemente que os homens e, uma vez examinadas, estão mais propensas a serem operadas para a correção do problema (Proffit *et al.*, 1990). Isso talvez ocorra por estarem mais preocupadas em mudar seu perfil facial (Watanabe *et al.*, 2005) e porque o prognatismo, pelas próprias características anatômicas, é mais perceptível nas faces femininas que masculinas (Arienza, 1971).

Na construção dos heredogramas, os relatos de histórias familiares são muito importantes, mas tendem a ser inexatos, incluindo tanto falsos positivos quanto falsos negativos. Pouco se pode fazer a respeito dos falsos negativos (as informações podem

ser muito difíceis de serem obtidas, sobretudo a respeito dos familiares já falecidos). Os falsos positivos são talvez a maior problema, porque há uma tendência para as famílias superestimarem os relatos de doenças, particularmente quando o diagnóstico é incerto (Thomas, 2004). Para minimizar os possíveis erros devido à falta de informação a respeito dos *status* fenotípicos das terceiras e quartas gerações de parentes (avós e bisavós), alguns autores usam somente duas gerações em suas análises de segregação e usam os dados obtidos das terceiras e quartas gerações somente para calcular os valores de penetrância (Vries *et al.*, 2004). Entretanto neste trabalho, todas as três gerações, no mínimo, foram consideradas nas avaliações, pois desta forma os heredogramas poderiam ser mais informativos.

Os poucos trabalhos na literatura a respeito de validação das histórias familiares sugerem que a especificidade é alta para parentes de primeiro grau (tipicamente 80-90%), mas muito menor para parentes de segundo grau. Além disso, é importante a consulta de outros membros da família que podem reportar casos omitidos pelos probandos (Thomas, 2004). Nesta pesquisa, aparentemente os probandos nas entrevistas se lembraram mais de reportar os casos de parentes falecidos afetados do que os não-afetados, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa a ponto de prejudicar a avaliação dos resultados. Talvez isso tenha ocorrido em função do prognatismo mandibular ser uma característica marcante na face de um indivíduo e por isso mais difícil de ser esquecida.

Um exemplo de como uma informação a respeito do *status* fenotípico de parentes falecidos pode ser importante pode ser visto na família 35 (ANEXO 2), onde o padrão de herança no heredograma parecer ser autossômico dominante, apesar dos indivíduos 1 e 2 aparentemente não serem afetados. Nesse tipo de herança, espera-se que todos os indivíduos que apresentem um determinado fenótipo possuam ao menos um dos pais afetados, a não ser que a penetrância seja incompleta. No caso em questão, a penetrância poderia ser completa se a informação relatada a respeito do *status* fenotípico de ao menos um dos dois indivíduos estivesse errada, mas essa informação não pôde ser comprovada uma vez que os indivíduos já haviam falecido na época da investigação.

Para evitar que um erro de diagnóstico incluísse um probando síndrômico na amostra, todos os indivíduos analisados passaram por uma inspeção visual. No entanto, casos relatados na literatura mostram que, às vezes, mesmo após um exame clínico genético cuidadoso, algumas síndromes podem não ser detectadas sem que se faça

também um exame citogenético (Satge *et al.*, 1996). Por exemplo, pode-se citar o caso de uma mulher de 22 anos de idade, que procurou assistência médica para hipofertilidade após dois abortos espontâneos. Clinicamente a paciente possuía inteligência normal e um discreto prognatismo mandibular, sem nenhum outro caso relatado na família. Entretanto, estudos citogenéticos mostraram um leve mosaicismo para trissomia do 18, embora se saiba que, geralmente, essa alteração cromossômica está associada a um severo retardo mental, atrasos no desenvolvimento, déficit de crescimento, malformações craniofaciais e malformações cardíacas graves, de maneira que somente 10% dos bebês sobrevivem ao primeiro ano de vida (Satge *et al.*, 1996).

A análise cefalométrica é, sem dúvidas, a melhor ferramenta disponível atualmente para caracterizar e definir Classe III esquelética, até que as análises tomográficas tridimensionais se tornem mais acessíveis. As variáveis cefalométricas devem ser medidas angulares e lineares clássicas, bem conhecidas, fáceis de serem manuseadas e de utilidade clínica (Bui *et al.*, 2006). Das sete medidas utilizadas em estudo semelhante, quatro coincidem com as utilizadas em nosso estudo (SNA, SNB, ANB e ângulo goníaco) (Watanabe *et al.*, 2005)

Porém, além de realizar medições precisas, é fundamental saber interpretar os valores encontrados. Por exemplo, tão importante quanto a posição da mandíbula em relação à maxila (ângulo ANB) é a posição relativa da mandíbula em relação à base do crânio, e também quais aspectos da morfologia esquelética parecem estar associados com o prognatismo mandibular relativo (El-Gheriani 2003; Milicesco, 1968), por exemplo, os indivíduos que não apresentavam ângulos ANB tão negativos, mas que tinham um ângulo do plano mandibular extremamente elevado (SNGoGn) e mandíbulas muito longas (GoGn) foram classificados como afetados e incluídos na amostra, se os demais critérios de inclusão apontassem na mesma direção.

As análises cefalométricas realçam as dificuldades no estudo dessa característica, pois as medidas lineares e angulares variaram bastante mesmo entre os indivíduos com prognatismo. Diferenças perceptíveis nas medidas cefalométricas garantem a noção de que há mais de um tipo de prognatismo mandibular (El-Gheriani 2003; Jacobson, 1974). De fato, alguns autores definiram recentemente cinco padrões diferentes de Classe III esquelética (Bui *et al.*, 2006).

Em termos práticos, é difícil coletar somente casos de prognatismo mandibular isolado, sem que haja o envolvimento do crescimento maxilar, uma vez que o crescimento e o desenvolvimento dessas duas estruturas estão intimamente ligados



(Singh, 1999). Um estudo experimental do crânio e exames com raios-X mostrou que o prognatismo mandibular geralmente envolve anormalidades de dimensão, posição, orientação e crescimento vertical da maxila (Cadenat *et al.*, 1971). O ideal seria que os estudos genéticos restringissem a amostra somente a um determinado sub-fenótipo, dentre os cinco padrões existentes de classe III esquelética (Bui *et al.*, 2006). Desta maneira se poderia ter uma amostra mais homogênea. Porém em nosso trabalho, se fossem feitas tais restrições, a quantidade de famílias e de indivíduos a serem analisados seria insuficiente para se ter resultados estatisticamente significantes. Além disso, muitas vezes em uma mesma família foram encontrados diferentes padrões fenotípicos.

Um outro aspecto levado em consideração durante a seleção da amostra foi em relação ao prognatismo mandibular funcional, que à primeira vista pode apresentar os mesmos aspectos clínicos do prognatismo mandibular verdadeiro, mas que se incluídos erroneamente na amostra poderiam causar desvios sérios nos resultados estatísticos (Leal, 1970). Para evitar esse risco, tanto a história familiar e clínica, como a avaliação cefalométrica, onde as radiografias são tomadas sempre em relação cêntrica, foram usadas para ajudar no diagnóstico diferencial (Leal, 1970; Milicesco, 1968). Os problemas funcionais se devem a uma alteração na posição e atividade muscular causadas por interferências oclusais; o comprimento mandibular é normal (Milicesco, 1968), enquanto que o prognatismo verdadeiro é causado por um maior crescimento ósseo da mandíbula. Prognatismos funcionais não tratados em pacientes em crescimento podem levar a prognatismos verdadeiros, mas nesses casos aparentemente não há envolvimento genético (Leal, 1970).

A seleção da amostra e caracterização do fenótipo também levou em relação a idade de ocorrência do prognatismo mandibular. Um padrão distinto de Classe III poderia ser detectado em crianças ainda na fase de dentição decídua completa (4-6 anos de idade). Porém, é bem conhecido que a mandíbula segue a curva geral de crescimento esquelético, que atinge seu pico máximo durante a puberdade (12-16 anos de idade), e que esse crescimento continua até o final da puberdade e início da idade adulta, até a terceira década de vida (Tollaro *et al.*, 1994; Cruz e Bolognese, 1994; Behrents, 1985).

Estudos de análise de segregação similares a este, que avaliavam puberdade precoce, simplesmente excluíram da amostra os meninos com idade abaixo de 9 anos e as meninas abaixo de 8 anos de idade, uma vez que eram muito novos para se determinar a presença do fenótipo (Vries, 2004). Em nosso estudo usamos o ponto de corte de 15 anos de idade, proposto por Litton *et al.* (1970), de forma que todas as

crianças não afetadas abaixo dos 15 anos de idade foram classificadas como de fenótipo desconhecido, pois tinham possibilidade de desenvolver o problema mais tarde. Uma outra importante consideração no que diz respeito ao fator idade é que para muitas doenças que ocorrem tanto de forma familiar (múltiplos casos em uma mesma família) quanto esporádica (um ou outro caso na família), uma observação comum é que a forma familiar tende a ocorrer em idades mais precoces. A literatura mostra que várias doenças seguem esse padrão, tais como o câncer de mama, o colo-retal e o retinoblastoma (Thomas, 2004). Dessa maneira, é razoável dizer que deve existir uma tendência geral para que o prognatismo mandibular familiar se manifestasse mais cedo que aquele que ocorre de forma esporádica.

No que se refere à formação da amostra, populações isoladas e geneticamente homogêneas sempre foram consideradas ideais em estudos genéticos. Na ausência dessas populações ideais, uma estratégia seria a estratificação da população (probandos e seus familiares) por afinidades quanto à ancestralidade quando se faz a coleta da amostra, buscando assim evitar um viés nos resultados (Gass *et al.*, 2003). Essa recomendação se baseia no conhecimento de que os alelos, de uma forma geral, se originam em populações e/ou regiões geográficas específicas, sendo esperado uma maior ocorrência desses alelos em indivíduos descendentes dessas populações apresentando, por consequência, diferentes taxas de doenças e diferentes frequências genótípicas (Cavalli-Sforza, 1994). Na mesma linha de pensamento, existem inúmeros exemplos de respostas diferenciadas a agentes ambientais ou drogas nos diversos grupos populacionais (Wilson *et al.*, 2001; Wood, 2001). Entretanto é complexo aplicar essa estratégia.

A primeira razão para isso é que algumas populações são muito complexas em termos de miscigenação racial e seria muito difícil dizer quem pertence a que grupo. A população brasileira, por exemplo, apresenta uma alta diversidade étnica, sendo que a cor da pele, principal característica morfológica utilizada em estratificações, é um pobre indicador de ancestralidade genética (Parra *et al.*, 2003). A segunda razão é que mesmo que se buscasse conhecer a ancestralidade genética dos indivíduos cujos dados fossem acessados, em um país tão miscigenado quanto o Brasil seria extremamente difícil coletar uma amostra uniforme que seja suficientemente grande para ser estatisticamente significativa.

O padrão familiar do prognatismo mandibular observado na inspeção visual dos heredogramas sugere a predominância de herança autossômica dominante. A

observação de uma família (família 3) com mais de um padrão de herança, uma associação de autossômico dominante e casos esporádicos, poderia sugerir a segregação de dois ou mais diferentes genes ou grupos de genes na mesma família. Esse resultado está de acordo com os encontrados por outros autores (Watanabe *et al.*, 2005; El-Gheriani *et al.*, 2003; Wolff *et al.* 1993; McKusick, 1972; Grabb *et al.*, 1968; Kraus *et al.*, 1959; Stiles e Luke, 1953; Strohmayer, 1937; Rubbrecht, 1930).

Mas nem sempre é fácil estabelecer o padrão de herança apenas visualmente. Análise semelhante realizada em uma população da Líbia também encontrou um padrão de herança predominantemente dominante, mas os autores sugerem que, assim como outras malformações faciais, a herança deve ser poligênica e multifatorial (El-Gheriani *et al.*, 2003). Isto ocorre quando os fenótipos são produto de uma interação de diferentes genes, cada um com um pequeno, mas substancial efeito, com componentes ambientais, ou seja, esses genes tornariam os indivíduos suscetíveis aos agentes ambientais (Mossey, 1999<sup>a</sup>).

Além disso, pode haver uma significativa heterogeneidade etiológica, ou seja, um mesmo defeito em um gene pode produzir diferentes anomalias fenotípicas e uma característica qualquer pode ocorrer em função da atividade gênica defeituosa em diferentes células. De maneira inversa, diferentes defeitos genéticos ou combinação de defeitos genéticos podem produzir anomalias fenotípicas similares. Outros agentes coadjuvantes podem fazer um defeito gênico “saltar” uma geração e com isso também complicar o cenário de diagnóstico. Exemplo disso são os heredogramas pequenos, em função da baixa atividade reprodutiva, e os fenômenos de impressão genômica (*imprinting* genômico), isto é, ativação diferencial de genes por efeito de origem parental (Mossey, 1999<sup>a</sup>). Esses fatos poderiam explicar alguns eventos encontrados em alguns heredogramas desta amostra onde, embora apresentando um padrão de herança autossômico dominante, algumas gerações foram “saltadas”.

Outro ponto a ser levado em consideração na avaliação dos heredogramas é a ocorrência de consangüinidade. Essa questão, muitas vezes negligenciada durante a anamnese, é um fator que pode auxiliar na definição do padrão de herança e explicar alguns padrões complexos onde indivíduos afetados, posicionados distantes no mesmo heredograma, podem compartilhar os mesmos alelos. Apesar de ter sido raramente relatado durante as entrevistas, acredita-se que muitos indivíduos, a princípio sem grau de parentesco, posicionados em nossos heredogramas em diferentes ramos de uma mesma grande família, poderiam ser primos distantes. Existiriam duas razões principais

para isso: por se tratar de famílias muito numerosas, e pelo fato que muitas das famílias pesquisadas eram oriundas de pequenos vilarejos na região do entorno de Brasília, onde o casamento entre parentes é um fato relativamente comum.

A consangüinidade poderia explicar padrões complexos de herança do prognatismo mandibular encontrados em algumas famílias de nossa amostra, onde indivíduos afetados, posicionados distantes no mesmo heredograma, poderiam estar compartilhando os mesmos alelos; desta maneira o modelo genético poderia ser considerado autossômico recessivo se os mesmos fossem primos distantes. É o caso do heredograma da família 6 (ANEXO 2), que claramente apresenta um padrão de herança dominante com penetrância incompleta. Porém, se considerássemos os indivíduos 4 e 8 como primos (informação desconhecida), poderíamos dizer que este modelo genético poderia ser autossômico recessivo e que ambos seriam portadores do mesmo alelo no mesmo *locus* gênico.

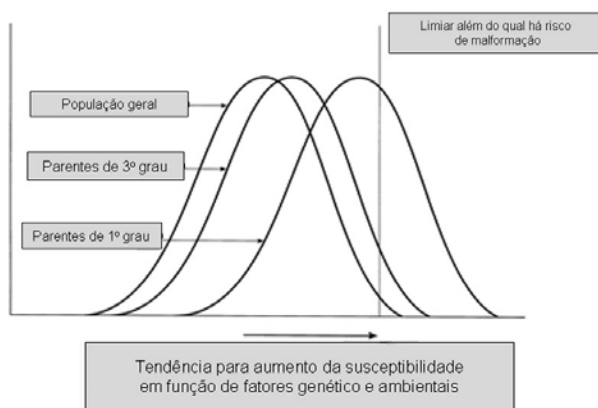
Em três famílias (5% da amostra), o fenótipo foi encontrado em uma única pessoa, o probando, cujos pais não eram afetados e onde não havia nenhuma história familiar, como por exemplo, na família 13 (ANEXO 2). Esse resultado é bem diferente do valor encontrado por Watanabe *et al.* (2005) em um estudo semelhante, onde 31,4% das 105 famílias estudadas apresentaram apenas o probando com prognatismo mandibular. Nesses casos esporádicos, uma primeira conclusão é de que se trate de um padrão de herança autossômica recessivo com rara história familiar. Porém, pode ser também fruto de uma etiologia não-genética (fenocópias) ou de uma mutação nova dominante (Vries *et al.*, 2004), pois apesar dos genes serem usualmente transmitidos inalterados de uma geração para a outra, podem ocorrer eventos (mutações) que causam alterações nos mesmos (Mossey, 1999<sup>a</sup>).

Uma outra explicação possível para esses casos esporádicos seria incluir o prognatismo mandibular no rol de fenótipos chamados de características multiforiais descontínuas. A explicação mais aceita repousa na suposição de que há uma escala básica de variação contínua da susceptibilidade para desenvolver uma dada condição, resultante de uma combinação de todas as influências genéticas e ambientais. A condição está presente somente quando a susceptibilidade excede um valor limiar crítico e quanto maior o nível de susceptibilidade além desse limiar mais severo é o problema.

Um exemplo clássico de característica multifatorial descontínua é a fenda labial e palatina. Os pais de um probando afetado são geralmente normais, e pode não haver

nenhuma história familiar, mas por produzir um filho afetado, supõe-se que os pais carreguem alguns alelos inativos relacionados a esse distúrbio. Entretanto, esses pais devem apresentar também alelos que permitem a ocorrência do fenótipo normal. Somente quando esse equilíbrio ultrapassa certo limiar a malformação ocorrerá. Para os familiares (parentes de primeiro grau) de uma criança afetada, existe uma tendência de aumento da susceptibilidade ao fenótipo anormal, de modo que poderíamos esperar encontrar uma frequência aumentada dessa malformação entre eles. À medida que o grau de parentesco vai ficando mais distante, a tendência à susceptibilidade diminui e se aproxima dos valores normais para a população em geral, com uma redução correspondente na incidência. Quanto mais severa a malformação em uma criança afetada, maior a susceptibilidade de seus pais e maior será a incidência em parentes mais próximos (Rao e Province, 2001; Mossey, 1999<sup>a</sup>).

A FIGURA 9 mostra um gráfico que ilustra bem essa curva de susceptibilidade. Para os familiares (parentes de primeiro grau) de uma criança afetada, graficamente a curva de susceptibilidade está deslocada para a direita, de modo que poderíamos esperar encontrar uma frequência aumentada dessa malformação entre eles. À medida que o grau de parentesco vai ficando mais longe, a curva de susceptibilidade se desloca para esquerda e se aproxima da curva para a população em geral, com uma redução correspondente na incidência. Quanto mais severa a malformação em uma criança afetada, mais deslocada para a direita está a curva de susceptibilidade de seus pais e maior será a incidência em parentes mais próximos (Rao e Province, 2001; Mossey, 1999<sup>a</sup>).



**FIGURA 9** – Gráfico mostrando as curvas de susceptibilidade para características multifatoriais descontínuas (Adaptado de Mossey, 1999<sup>a</sup>).

### **Análise complexa de segregação**

Na análise de segregação considerando a amostra total, excluído alguns ramos dos heredogramas para que houvesse apenas um fundador, o cálculo do valor da penetrância, ficou comprometido em função do valor de  $d$  ter atingido o limite ( $d = 1,00$ ) e foi estimado em 100%. Esse resultado de 100% é apenas um valor estatístico em relação ao gene principal para os núcleos familiares retirados dos heredogramas, onde um dos elementos é o probando ou um parente afetado.

No entanto, uma análise visual cuidadosa de todos os heredogramas mostrou que das 49 famílias que apresentaram um padrão de herança autossômico dominante, 32 famílias, ou 65,3% delas, apresentou penetrância incompleta, uma vez que o *status* de afetado não estava presente em todas as gerações. Essa informação está mais de acordo com o que já foi descrito quanto ao padrão de herança do prognatismo mandibular (El-Gheriani *et al.* 2003). Os baixos percentuais de prevalência entre os pais e avós de probandos também apóiam a sugestão de padrão de herança dominante com penetrância incompleta. (Vries *et al.* 2005). Outro indicativo foi a observação de uma baixa taxa de filhos afetados nascidos de um pai ou mãe afetada com um esposo ou esposa não afetado (1:1,78). A taxa esperada seria de 1:1 se fosse um padrão de herança autossômico típico com penetrância completa, considerando um cruzamento entre um heterozigoto e um homozigoto recessivo para a característica analisada.

A herdabilidade é definida como a proporção da variância fenotípica total que pode ser atribuída a fatores genéticos (Gass *et al.*, 2003; Mauchamp, 1979). Às vezes ela é mal interpretada. Não está relacionada à causa da variância de uma maneira geral, mas é dependente de fatores como a população e a época em que uma determinada característica está sendo avaliada. Sendo definida como a taxa entre a variância genotípica total e a variância fenotípica total, pode-se dizer que o numerador tem um significado genético simples, mas o denominador não. A variância fenotípica total inclui a variância atribuída aos genes, ao compartilhamento de condições ambientais, residual (atribuída a determinantes não compartilhados e não medidos) e os erros de medição (Thomas, 2004). Nesse estudo, a herdabilidade foi estimada em 31,6% +/- 0,059, corroborando a observação de que o prognatismo mandibular tem características multifatoriais. Esse valor está bem abaixo do valor encontrado por Watanabe *et al.* (2005) para os parentes de primeiro grau (pais, mães e irmãos) de probandos afetados (84,3%), mas é mais alto que o estimado para avós (7,4% ) e tios (7,7%), na mesma

pesquisa (Watanabe *et al.*, 2005). A correlação negativa encontrada entre mães e pais poderia indicar um casamento preferencial com não-afetados, isto é, a tendência de dois indivíduos prognatas evitarem formar um casal de duplos afetados.

De acordo com os dados da análise de segregação, tem-se que, em comparação com o modelo misto, deve-se rejeitar a hipótese de inexistência de associação familiar (modelo aleatório não convergiu), bem como aquela que propõe a inexistência de um gene principal (modelo sem gene principal não convergiu). Pode-se também aceitar a presença de um componente multifatorial, pois quando se compara o modelo misto e o modelo sem componente multifatorial, deve-se rejeitar o modelo maior (sem componente multifatorial) em favor do menor (misto). Além disso, enquanto a hipótese de transmissão mendeliana é aceita, pois os modelos misto e de  $\tau$ s livres podem ser considerados estatisticamente iguais e ambos podem ser aceitos, a hipótese que afirma haver uma influência ambiental importante é facilmente rejeitada (modelo  $\tau$ s iguais não convergiu). Por fim pode-se dizer que os modelos estritamente recessivo, aditivo e estritamente dominante para o fenótipo “prognatismo mandibular” foram rejeitados em favor de um modelo misto.

Geralmente, as análises de segregação trabalham com amostras coletadas aleatoriamente em uma determinada população. No caso deste trabalho, como é comum nos estudos de características com baixa incidência na população, a averiguação foi feita a partir de indivíduos probandos que haviam procurado um tratamento clínico para seu problema. Essa diferença de metodologia na coleta da amostra levou a duas implicações diretas: 1) não havia ocorrência de famílias sem nenhum indivíduo afetado, e 2) quanto maior o número de indivíduos afetados em uma família, maior seria a chance dessa família estar incluída na amostra. Como consequência direta dessas duas implicações, não seria adequado fazer inferências precisas sobre a epidemiologia do prognatismo mandibular.

Portanto, decidiu-se fazer uma segunda análise de segregação, considerando apenas os núcleos familiares (pais, mães e filhos), onde um dos indivíduos era o probando. Havia então duas possibilidades, usar 20 famílias nucleares com probandos, irmãos e pais, ou 54 famílias nucleares tipo probandos, cônjuges e filhos. O uso de probandos e seus irmãos poderia facilitar os cálculos, mas em razão de só existirem 20 famílias nucleares desse tipo, muitas famílias amostradas seriam perdidas. Por isso optou-se por utilizar os 54 núcleos familiares de probandos, cônjuges e filhos. Em função disso e em função de se ter considerado a incidência do prognatismo mandibular

em 2% da população geral, a frequência do gene nessa segunda análise foi mais próxima da frequência nas famílias estudadas (6%).

Nesta segunda análise, em comparação com o modelo misto, o modelo que mais se adequou foi o modelo estritamente dominante. A hipótese de inexistência de associação familiar foi rejeitada, bem como a que propõe a inexistência de um gene principal, podendo-se aceitar a participação de um componente multifatorial. Porém, não foi possível calcular os modelos de *taus* ( $\tau$ s livre e  $\tau$ s iguais), pois para estimar os *taus*, o tamanho das amostras deve ser maior. Por isso foi importante calculá-la na primeira análise, onde o “N” era maior. O modelo estritamente recessivo não pode ser descartado pois mostrou ser estatisticamente igual ao modelo misto. Mas o modelo aditivo foi rejeitado. O cálculo do valor de penetrância também ficou comprometido nessa segunda análise, pois três modelos diferentes foram aceitos: o misto, o estritamente dominante e o modelo recessivo; e sabe-se que para que o cálculo da penetrância tenha sentido, precisa-se de um modelo genético bem estabelecido. Por isso, para a estimativa de penetrância deve-se considerar a primeira análise.

Na segunda análise, a idéia de considerar em 2% a incidência do prognatismo mandibular na população e ainda indicar quem são os probandos, através da utilização de núcleos familiares, é uma forma de compensação para tentar corrigir o modelo de averiguação empregado para formar a amostra. O uso da frequência do gene na população tenta cobrir a lacuna de achar que os indivíduos de fora que chegam à família não tem o alelo da característica estudada.

Quando se compara a primeira e a segunda análises complexas de segregação realizadas, observa-se que a segunda é mais cuidadosa no momento que tenta corrigir o modelo de averiguação, mas é discutível no momento que tenta extrapolar os resultados da amostra desse estudo para a população em geral. A primeira análise apresenta um número maior de indivíduos, então é capaz de apresentar maiores diferenças entre os valores de verossimilhança máxima. Os resultados finais de uma e de outra não são discrepantes, pode-se dizer até que são complementares.



## **VI – Conclusão**

A avaliação dos 55 heredogramas e os resultados encontrados nas duas análises de segregação realizadas indicam que há fortes evidências de um gene principal determinando o acometimento do prognatismo mandibular nas famílias estudadas, com um padrão de herança mendeliano, de caráter principalmente dominante, com penetrância incompleta. Sugere-se a existência de fatores ambientais e a ação de genes secundários (componentes multifatoriais), mas não é possível quantificá-los ou discriminar o papel de cada um deles, nem dizer qual ou quais são os responsáveis pela penetrância incompleta do gene principal.

Estudos prospectivos maiores são necessários para confirmar esses achados. Análises de ligação de casos familiares podem ajudar a buscar indicações da localização cromossômica do gene candidato e com isso, ajudar a esclarecer os mecanismos fisiológicos envolvidos no aparecimento do prognatismo mandibular, contribuindo para uma melhor compreensão de sua patogênese.

## CAPÍTULO 2

*Análise de ligação de seis loci microssatélites situados próximos a genes candidatos ao prognatismo mandibular em famílias brasileiras*

## **I - Introdução**

Uma vez que existe uma especificidade intra-específica na ordem dos genes, distribuídos ao longo de cada um dos 22 cromossomos autossômicos humanos e dos dois sexuais, é possível construir os chamados mapas gênicos. Nos últimos anos vários genes responsáveis por doenças ou malformações estão sendo mapeados com a ajuda de marcadores moleculares.

Dentre os marcadores mais utilizados estão os microssatélites ou STR (*Short Tandem Repeats*), descritos em 1985 (Jeffreys *et al.*, 1985). Os microssatélites são repetições em *tandem* de mono, bi, tri e tetranucleotídeos, multialélicos, que apresentam alta heterozigose (a maioria entre 70 e 90%) (Jeffreys *et al.*, 1985). A descrição de múltiplas regiões genômicas contendo STR ao longo de todos os cromossomos está viabilizando a realização de estudos de ligação utilizando genes candidatos ou escaneamento do genoma total (Rao e Province, 2001).

No presente trabalho, testou-se a ligação gênica entre seis marcadores do tipo microssatélites localizados próximos a regiões candidatas ao prognatismo mandibular em famílias brasileiras portadoras dessa malformação. Desses seis marcadores, três STRs mostraram previamente resultados positivos quanto à ligação com o prognatismo mandibular em famílias japonesas e coreanas (Yamaguchi *et al.*, 2005) e os outros três estão localizados próximos a genes também relacionados com o desenvolvimento craniofacial ((Jacob *et al.*, 2006; Rump *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2006; Stevens e Roeder, 2006; Stein *et al.*, 2004; Yoshida *et al.* 2004).

### **Ligação gênica**

Os genes que estão situados no mesmo cromossomo são ditos sintênicos, enquanto que os genes sintênicos que estão fisicamente próximos são ditos ligados. Os genes são considerados completamente ligados caso os alelos dos mesmos não possam ser separados por recombinação e parcialmente ligados quando há recombinação entre eles em uma taxa inferior a 50%. *Loci* em diferentes cromossomos segregam juntos somente ao acaso (Teare e Barret, 2005).

Análise de ligação é o processo de busca da localização aproximada de um gene pela observação de evidências de co-segregação com marcadores genéticos cujas localizações já são conhecidas. Co-segregação é a tendência de dois ou mais genes

serem herdados juntos e, conseqüentemente, de indivíduos com fenótipos similares apresentarem os mesmos alelos para o *locus* do marcador (Thomas, 2004).

A idéia básica da análise de ligação é determinar os genótipos de vários marcadores, cujas localizações sejam conhecidas, para vários membros de uma família com múltiplos casos da doença e averiguar a co-segregação com a característica de interesse. Famílias extensas com muitos casos de afetados ainda vivos são altamente informativas para esse propósito. Após a genotipagem é possível extrapolar como é a constituição alélica dos indivíduos com relação aos *loci* analisados. Para tanto, os dados mais informativos são aqueles dos indivíduos cujos pais são heterozigotos para os *loci* em questão e cujos genótipos já sejam conhecidos, pois dessa forma é possível inferir com relativa certeza de onde veio cada um dos alelos dos filhos. Com a utilização dos microssatélites como marcadores as análises tornaram-se mais factíveis, pois o número de indivíduos heterozigotos é maior.

O marcador e a variante genética causal não estão necessariamente localizados dentro do mesmo gene. Ao incorporar a biologia da formação dos gametas e recombinações cromossômicas nos modelos matemáticos que calculam a extensão na qual um dado marcador tende a ser transmitido em conjunto com uma dada característica em uma determinada família, pode-se estimar se uma variante genética causal pode estar localizada perto daquele marcador e, se estiver, quão perto está. (Burton *et al.*, 2005).

A análise de ligação se baseia em dois princípios. O primeiro é que genes em diferentes cromossomos segregam independentemente, de tal maneira que não pode haver ligação entre eles. O segundo princípio é que a fração  $\theta$  de recombinação entre dois *loci* no mesmo cromossomo aumenta com o aumento da distância física entre eles, eventualmente atingindo o valor limite de 0,5, ou seja a mesma probabilidade de recombinação de dois cromossomos não homólogos. É exatamente esse gradiente de probabilidades de recombinação que permite que a análise de ligação determine a provável localização de um gene (Thomas, 2004; Rao e Province, 2001). Isso pode ser mostrado graficamente na FIGURA 1.

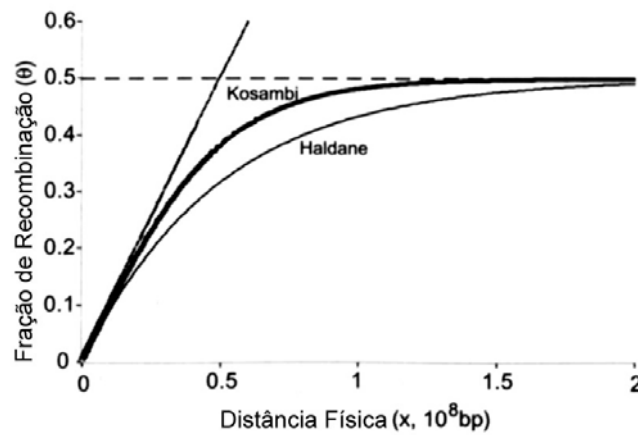


FIGURA 1 - Mapa de Haldane, que mostra a relação entre a distância física ( $x$ ) em pares de base (pb) e a fração de recombinação ( $\theta$ ) em Morgans (M), e o Mapa de Kosambi, que faz uma correção no mapa de Haldane, levando em consideração o fenômeno da interferência (adaptado de Thomas, 2004).

As distâncias no mapa (FIGURA 1) expressam a localização dos marcadores em relação a uma lista estabelecida de outros marcadores cuja ordem e localizações já foram estabelecidas previamente (ao menos aproximadamente). Essas distâncias  $x$  são expressas em centiMorgans (cM), onde 1 cM representa a distância na qual o número esperado de eventos de recombinação é 1%. As frações de recombinação, sendo probabilidades, são quantias não dimensionáveis, geralmente expressas em percentuais, apesar do termo cM e percentuais serem freqüentemente utilizados de maneira indistinta, com o mesmo significado. A distância física é medida em pares de base (pb) de DNA, de tal maneira que 1 cM corresponde em média a aproximadamente 1 milhão de pb, apesar desse fator de proporcionalidade variar ao longo do genoma e de acordo com o sexo e com outros fatores (Thomas, 2004).

Porém, dado que um evento ocorreu em um determinado local, a probabilidade de que um outro aconteça nas imediações é mais baixa que a taxa global, um fenômeno conhecido como interferência. Baseado em teorias matemáticas sobre interferência, derivou-se uma variação de outro mapa de função, talvez o mais utilizado, chamado de mapa de Kosambi (FIGURA 1) (Thomas, 2004).

Portanto, se um marcador genético apresenta uma baixa taxa de recombinação com relação a um gene de uma doença, pode-se inferir que o gene dessa doença deve estar bem perto daquele marcador. Na prática, em princípio, procuram-se os núcleos

familiares pai-mãe-filhos (meioses), nos quais os pais são duplamente heterozigotos (para o gene da doença e para o marcador) e conta-se o número de ocasiões na qual o haplótipo transmitido é um recombinante ou um não-recombinante. No método direto calcula-se a proporção de recombinantes em relação ao número total de meioses; o resultado é uma estimativa direta da fração de recombinação ( $\theta$ ) (Thomas, 2004; Rao e Province, 2001). Esta fração de recombinação, ou seja, proporção de meioses que resulta em recombinação, indica quão distantes estão dois genes (Burton *et al.*, 2005; Teare e Barret, 2005; Rao e Province, 2001).

A dificuldade é que a não ser que o gene da doença seja totalmente penetrante, sem a presença de fenocópias, não se podem determinar os genótipos dos indivíduos nos locus da doença, e mesmo se fosse possível, nem sempre seria possível descobrir as fases. Na prática, muitas meioses não são totalmente informativas, então métodos mais complexos são necessários para explorar os dados disponíveis, como por exemplo, o *Lod score* (Thomas, 2004).

### ***Lod scores***

Do mesmo modo que em qualquer estudo estatístico, deve-se ter cautela em garantir que os resultados obtidos em um estudo de ligação não são devidos apenas ao acaso. Por exemplo, considerando a análise de um *locus* marcador bialélico para uma dada família afetada com uma determinada característica ou malformação, é possível que toda a prole afetada herde um dado alelo enquanto que a prole não afetada herde o outro alelo, mesmo quando este não está ligado ao gene da doença, por acaso. Esse resultado enganador torna-se menos provável à medida que aumenta o número de indivíduos analisados (Thomas, 2005; Burton *et al.*, 2005; Rao e Province, 2001).

O método padrão utilizado, ainda considerado como a ferramenta mais eficaz em análises genéticas para determinar se o resultado de uma análise de ligação não é fruto apenas do acaso, foi inicialmente descrito por Morton (1955). Basicamente é a comparação da probabilidade de que dois *loci* estejam ligados com uma determinada fração de recombinação *versus* a probabilidade de que os dois *loci* não estejam ligados. A hipótese nula representa ausência de ligação entre a característica e o *locus* do marcador (fração de recombinação = 50% ou  $\theta = 0,5$ ) e a hipótese alternativa pressupõe que essa ligação exista ( $\theta < 0,5$ ) (Teare e Barret, 2005; Thomas, 2004; Rao e Province, 2001).

Por exemplo, para testar a hipótese de que dois *loci* estejam ligados com uma fração de recombinação de  $\theta = 0,1$  versus a hipótese de que eles não estejam ligados ( $\theta = 0,5$ ), usam-se os dados de heredograma para calcular uma taxa de probabilidade. Se os dados indicarem que  $\theta$  é mais provavelmente igual a 0,1 que a 0,5, então a taxa de probabilidade será maior que 1,0. Se, entretanto, os dados de heredograma são contra a ligação dos dois *loci*, então o denominador será maior que o numerador, e a taxa será menor que 1,0. Por convenção, usa-se o logaritmo dessa taxa, chamado de logaritmo das chances (*Logarithm of the odds*) ou *Lod score* (Rao e Province, 2001).

Valores altamente positivos de *Lod score* (LOD) são evidências de ligação, e valores negativos são evidências contra a mesma (Teare e Barret, 2005). Quanto mais alto o valor do LOD, maior a evidência de ligação. Convencionalmente, um valor de +3 é considerado como uma evidência de ligação significativa em casos de análises paramétricas para características monogênicas. Esse valor indica que a probabilidade a favor da ligação é mil vezes maior que a probabilidade contra a ligação. E a hipótese de ligação é considerada descartada para todos os valores de  $\theta$  nos quais o LOD é menor que -2 (Teare e Barret, 2005).

As referências dos LODs para os critérios de inclusão ou exclusão (- 2 e + 3) foram originalmente estimadas para ligação de dois pontos para um único marcador com uma fração de recombinação fixa. Esses valores foram derivados da teoria de análise seqüencial e tem uma eficácia de 99% com uma taxa de 5% de falsos positivos (Thomas, 2004). Com os métodos multipontos, com mapas densos de marcadores e com a possibilidade de estudar doenças complexas com muitos genes envolvidos, critérios mais restritivos foram necessários o que visa maximizar o valor de LOD sobre a fração de recombinação. Isso aumenta o potencial de detectar ligação (Teare e Barret, 2005). Esse limiar varia nos casos de doenças complexas, podendo chegar a um valor de LOD igual a 4,0, nos casos de análises não paramétricas que usam pares de irmãos afetados (Kruglyak e Lander, 1995).

O *Lod score* é calculado somando-se as contribuições das probabilidades sobre todas as combinações de marcadores e genótipos da característica (incluindo as fases dos duplos homozigotos). Em razão de existir muito mais combinações que as existentes nas análises de segregação, um modelo de expressão do fenótipo deve ser especificado (Teare e Barret, 2005; Thomas, 2004; Rao e Province, 2001). Esse modelo inclui o padrão de herança e a frequência do alelo da característica e é geralmente

estabelecido fixando-se os parâmetros de penetrância e frequência alélica em valores determinados em análises de segregação prévias, realizadas na mesma amostra, e depois avaliando os LODs sobre um conjunto de valores de  $\theta$  (Teare e Barret, 2005).

O objetivo final da análise é estimar a fração de recombinação entre um único gene da característica e um único *locus* marcador (análise de dois pontos) ou a posição do *locus* da característica em relação a um mapa fixo de marcadores. Nesse caso, dois ou mais *loci* de marcadores são usados simultaneamente (análise de múltiplos pontos) (Teare e Barret, 2005).

### **Estratégias utilizadas na identificação de loci relacionados a características complexas**

Existem duas estratégias básicas para se identificar *loci* para características complexas. Uma dessas é o escaneamento do genoma inteiro, onde polimorfismos anônimos uniformemente distribuídos ao longo do genoma são testados em busca de ligação com um *locus* da característica. A segunda estratégia usa genes candidatos, que a partir do conhecimento prévio a respeito das bases biológicas do problema a ser estudado, traça hipóteses para testar vários genes já conhecidos que possam ter alguma participação na manifestação do fenótipo (Rao e Province, 2001).

A busca sistemática pelo genoma humano de ligação entre o *locus* de uma característica e *loci* de marcadores moleculares de localização conhecida é denominada escaneamento do genoma total. Essa metodologia, quando famílias extensas são utilizadas, tem permitido identificar os *loci* principais de susceptibilidade para uma doença específica (Sharma *et al.* 2000).

Os primeiros escaneamentos foram feitos rastreando o genoma total com 70 ou 80 marcadores e nos casos em que houvesse indicação de uma região de possível ligação, aumentava-se o conjunto de marcadores próximos à região. Porém, com essa abordagem deixava-se de examinar regiões importantes. Atualmente, com o desenvolvimento da robótica e de métodos de análise em larga escala, são utilizados os mapas de alta resolução que empregam de 300 a 500 marcadores simultaneamente (Teare e Barret, 2005; Mah, 2001).

Quando uma região específica demonstra evidência de ligação (LOD positivo), estreita-se a busca excluindo todas as regiões com valores de LOD altamente negativos, concentrando os esforços apenas nas regiões estudadas que mostraram indícios de



ligação. Para isso adicionam-se marcadores para gerar um mapeamento mais denso capaz de cobrir aquela região, deixando-a com menos de 5cM (aproximadamente 5 milhões de pares de bases).

Buscas adicionais nas regiões de exclusão são um desperdício de recursos, a não ser, é claro, que o modelo genético tenha sido erroneamente estimado, e nesse caso, poder-se-ia obter evidências espúrias contra a ligação mesmo se um gene principal estiver localizado naquela região. Naturalmente, é melhor concentrar os esforços em regiões que já foram previamente estudadas e que mostraram indícios de ligação (Thomas, 2004).

Nos casos de rastreamentos genômicos utilizando pares de irmãos afetados, e onde não se conhece o modo de herança, recomenda-se que se exclua de considerações futuras qualquer região com *Lod score* menor que -2 e que se investigue mais qualquer região com *Lod score* maior que 1 (Hauser *et al.*, 1996; Rish, 1990). Essa investigação pode incluir a genotipagem de outras famílias, de outros membros das mesmas famílias, marcadores adicionais ou análises adicionais.

Quando existem fortes indicativos da presença de um gene principal envolvido e regiões já foram excluídas, o limiar para excluir outras regiões pode aumentar, uma vez que o gene que se está procurando deve estar localizado em algum outro local. Para fenótipos complexos, deve-se ter mais cautela quanto aos mapas de exclusão, pois uma dada região pode conter um gene que esteja segregando relacionado com a característica somente em parte das famílias enquanto nas demais famílias outra região do genoma está envolvida. Dessa forma, o *Lod score* total para um marcador genético ligado pode ser negativo mesmo que algumas famílias contribuam com um *Lod score* positivo (Thomas, 2004).

Uma vez que as evidências acumuladas apontam para um resultado positivo, é necessário ainda, antes de proclamá-lo, se certificar que não se trata de um falso indicativo. Às vezes, um *locus* pode ser identificado em uma família, mas não confirmado em outras. Nesse caso, poder-se-ia pensar em uma herança poligênica ou heterogeneidade de *locus* (Thomas, 2004). Por outro lado, se for observado indícios de ligação com uma região candidata em várias famílias, o banco de dados do genoma humano pode ser acessado para a busca de genes candidatos de acordo com sua posição no cromossomo. Nesse caso, é necessário que haja uma repetição dos resultados em

vários outros testes antes que uma clonagem posicional se justifique (Sharma *et al.*, 2000).

Em relação ao tipo de análise a ser realizada, essa dependerá da estratégia escolhida e se enquadra em duas categorias: análise paramétrica ou não paramétrica. No caso das características que possuem um ou mais genes principais, com um modelo genético definido, usam-se as análises paramétricas. Porém, quando a característica for multifatorial, onde não se tem noção do modelo genético envolvido, usam-se as análises não paramétricas ou *model-free* (Teare e Barret, 2005; Rao e Province, 2001).

### **Análises paramétricas de ligação**

As análises paramétricas de ligação, baseadas no modelo genético, são aquelas que analisam a co-segregação de alelos específicos em *loci* gênicos específicos dentro de famílias com heredogramas bem conhecidos (Teare e Barret, 2005; Thomas, 2004; Rao e Province, 2001; Mossey, 1999<sup>a</sup>). Se o componente genético de uma doença é devido a poucos genes principais, é possível buscar evidências de ligação com os *loci* dos marcadores desta maneira. Entretanto, se o componente genético é formado por um grande número de genes distintos, as análises paramétricas de ligação podem ficar seriamente comprometidas e as alternativas *model-free* se tornam necessárias (Rao e Province, 2001).

### **Análises não-paramétricas de ligação (*model-free*)**

Para doenças multifatoriais, onde vários genes e fatores ambientais podem contribuir para aumentar o risco à doença, em geral não há um padrão claro de herança. Métodos para investigar a ligação foram então desenvolvidos de modo que não exigissem a especificação do modelo genético, do grau de penetrância ou da frequência alélica (Almasy e Blangero, 1998). Tais métodos são conhecidos como não-paramétricos, ou *model-free*. Possuem menor potencial para detectar evidências de ligação, quando comparados aos modelos paramétricos, se os parâmetros deste último são especificados corretamente. Métodos não-paramétricos são particularmente úteis para um escaneamento rápido de um grande número de *loci* de marcadores na busca por ligação, mas são menos úteis para mapeamento fino (Thomas, 2004).

Os métodos não-paramétricos se baseiam no princípio de que entre os familiares afetados espera-se encontrar um excesso de compartilhamento de haplótipos que são

idênticos por descendência (*identical by descent* ou IBD) na região do gene causador da doença, independente do padrão de herança. Esses métodos não estimam a fração de recombinação, mas testam se o compartilhamento de IBD em um *locus* é maior que o esperado sob a hipótese nula de ausência de ligação (Teare e Barret, 2005; Rao e Province, 2001).

Se uma característica é rara, então um indivíduo afetado tem muito mais probabilidade de carregar um ou mais alelos mutantes do que qualquer outro membro não afetado da população. Desta maneira, principalmente para fenótipos dicotômicos, os pares de afetados são muito mais informativos que os pares de afetados/não afetados ou de não-afetados/não-afetados (assumindo que o alelo mutante é raro) (Thomas, 2004).

As três abordagens mais usadas são:

**Pares de familiares (*relative pairs*)** – Considera todas as possibilidades de parentes em um tipo particular de relacionamento e determina se os pares com fenótipos similares tendem a ter os mesmos alelos para os marcadores, mais do que seria esperado ao acaso, dada a natureza do seu relacionamento. São úteis nos casos de fenótipos contínuos, onde todos os indivíduos são potencialmente informativos. A eficácia do método de pares de familiares depende de um número de fatores, incluindo o número de pares, seu relacionamento e o grau de polimorfismo do *locus* do marcador (Burton *et al.*, 2005; Thomas, 2004; Sharma *et al.*, 2000; Morton, 1983).

**Pares de irmãos afetados (*Affected sib pairs* ou *ASP*)**- A análise de pares de irmãos afetados é uma ferramenta cada vez mais importante para o estudo de características complexas (Kruglyak e Lander, 1995). Essa abordagem testa a hipótese de que tais pares, que possuem fenótipos similares (e têm por essa razão maior probabilidade de compartilharem alelos do *locus* da doença), compartilhem alelos na vizinhança do *locus* da doença, mais do que seria esperado em pares de irmãos escolhidos randomicamente (Burton *et al.*, 2005).

Espera-se que pares de irmãos compartilhem ao acaso dois alelos IBD (derivados do mesmo avô) um quarto das vezes, um alelo IBD em metade e que não compartilhem nenhum alelo um quarto das vezes. Essa situação é considerada verdadeira, independente do fenótipo, se os marcadores estudados não estiverem ligados a nenhum *locus* relacionado à doença. Se dois irmãos são ambos afetados pela doença, e um gene relacionado à doença está ligado a um determinado marcador, então se espera ver um maior compartilhamento de alelos marcadores IBD do que seria esperado ao

acaso. Por essa razão tabula-se simplesmente o número de alelos compartilhados IBD por todos os pares de irmãos afetados e compara-se essa distribuição com a distribuição esperada usando um teste qui-quadrado. Esse procedimento provê um teste para a hipótese nula, mas não estima o valor de  $\theta$  (Thomas, 2004; Teare & Barret, 2005).

Na prática, o compartilhamento de IBD entre um par de irmãos pode ser difícil de ser obtido quando os genótipos dos pais são desconhecidos e nos casos em que os marcadores selecionados não são suficientemente informativos para distinguir entre o compartilhamento de IBD ou de IBS (*identical by status*). Em tais casos, podem-se estimar somente as proporções de compartilhamento de IBD. Um algoritmo geral para o cálculo dessas proporções considera todos os genótipos parentais possíveis que sejam consistentes com os dados (Teare e Barret, 2005). Apesar dos pares afetados serem os mais informativos para a ligação, os irmãos não afetados podem também ser úteis nos casos em que não há disponibilidade dos genótipos parentais ou esses não forem informativos. Dessa forma, a inclusão dos irmãos não afetados pode auxiliar na determinação do *status* IBD.

**Pares de familiares afetados (*Affected relative pair methods*)** – Em princípio, o método de pares de irmãos afetados pode ser generalizado para qualquer forma de pares de familiares. Métodos alternativos têm sido desenvolvidos para analisar famílias com grande número de indivíduos afetados com diferentes graus de parentesco, também se baseando no grau de compartilhamento de IBD. É atribuído um *score* a cada heredograma de acordo com o compartilhamento de IBD e o teste de ligação é baseado na comparação desse *score* com o valor esperado de acordo com a hipótese nula (Teare e Barret, 2005; Rao e Province, 2001). O valor desse *score* aumenta à medida que o número de membros afetados que compartilha os mesmos alelos IBD aumenta (Kruglyac *et al.*, 1996).

Na prática, os relacionamentos IBD podem ser difíceis de se determinar para parentes mais distantes, então os métodos IBS (*identical by status*) são mais comumente usados. Se as frequências dos alelos marcadores na população são conhecidas, pode-se simplesmente formar uma tabela de eventualidades para cada tipo de relacionamento, derivando as distribuições esperadas do compartilhamento de alelos seguindo os procedimentos gerais usados nos casos de irmãos afetados. Em geral, entretanto, as frequências dos alelos não são conhecidas e devem ser estimadas dos dados, então o teste de significância deve refletir a variabilidade da amostra nessas estimativas. Testes

mais eficazes podem ser empregados usando grande quantidade de parentes afetados, porém são métodos bem mais complexos (Thomas, 2004).

### **Abordagem para análise de ligação utilizando marcadores próximos a regiões candidatas ao prognatismo mandibular**

Apesar do grande número de trabalhos publicados a respeito do diagnóstico e tratamento clínico/cirúrgico do prognatismo mandibular, poucos estudos até agora têm se dedicado à busca da localização genômica do(s) gene(s) responsável(veis). Até o momento, apenas um trabalho nessa direção foi publicado. Uma análise não-paramétrica foi realizada no Japão, utilizando 90 pares de irmãos afetados, em uma amostra composta de famílias japonesas e coreanas. Foi feito um escaneamento do genoma total com 405 microssatélites simultaneamente e a melhor evidência de ligação ao prognatismo mandibular foi detectada próxima ao marcador D1S234. Também foram encontradas evidências mais sutis de ligação com os marcadores D6S305 e D19S884 (Yamaguchi *et al.*, 2005).

O marcador D1S234 se localiza na região 1p36.11, que é a localização genômica do gene RUNX3 (1p36). Já o marcador D6S1689 se localiza na região 6p12, muito próxima da localização genômica do gene RUNX2 (CBFA1) que é 6p21. A família RUNX é responsável pela expressão de proteínas importantes para o processo de osteogênese em mamíferos (Stein *et al.* 2004). Os subtipos mais importantes são RUNX1, RUNX2 e RUNX3. RUNX2 é considerada a principal chave-mestre da osteogênese, enquanto que RUNX1 e RUNX3 são expressos nas células ósseas e parecem participar do desenvolvimento e diferenciação das mesmas (Stein *et al.*, 2004). RUNX2 também parece ser essencial para a diferenciação dos osteoblastos. Por outro lado, RUNX2 e RUNX3 parecem estar envolvidos também na diferenciação de células mesenquimais em condrócitos, bem como na proliferação e maturação dessas células, etapas fundamentais no desenvolvimento esquelético (Yoshida *et al.*, 2004).

Um estudo que tenha o objetivo de buscar evidências de ligação para uma determinada característica utilizando genes candidatos deve utilizar os resultados conseguidos em outras pesquisas, além de procurar englobar outras regiões candidatas.

No presente trabalho foi realizada uma abordagem dessa natureza para a busca da localização genômica de *locus* relacionado ao prognatismo mandibular. Nesse caso, foram utilizados os marcadores genéticos que mostraram evidências de ligação em trabalho prévio (Yamaguchi *et al.*, 2005), assim como foram testados outros marcadores

localizados próximos a prováveis genes candidatos para a Classe III esquelética, os marcadores D4S3038, D7S503 e D10S1483.

A localização de D4S3038 é 4p16.3, que também é a localização de FGFR3. Já o marcador D10S1483 está localizado na região exata do FGFR2 (10q26). As proteínas expressas por esses genes fazem parte da família dos receptores para os fatores de crescimento dos fibroblastos. Nesse grupo de genes, a seqüência de aminoácidos é altamente conservada entre seus membros assim como há conservação evolutiva também. Um produto gênico se diferencia de outro quanto às afinidades de ligação e na sua distribuição pelos tecidos. A porção extracelular da proteína interage com os fatores de crescimento dos fibroblastos, colocando em movimento uma cascata de sinais à jusante, que ao final influenciam a atividade mitogênica e a diferenciação dos mesmos (Jacob *et al.*, 2006).

O gene FGFR3 está relacionado ao hormônio de crescimento dos fibroblastos e tem um papel importante no desenvolvimento e manutenção óssea. Mutações nesse gene levam à craniosinostose e a múltiplos tipos de displasias esqueléticas (Jacob *et al.*, 2006; Rump *et al.*, 2006). Já o FGFR2 tem relação com o aparecimento de algumas síndromes, como as de Saethre-Chotzen e de Pfeiffer, que também apresentam como características clínicas a craniosinostose e a hipoplasia de terço médio de face. Estudos têm mostrado que mutações nesse gene foram encontradas em famílias onde essas síndromes segregavam (Freitas *et al.*, 2006; Stevens e Roeder, 2006). Uma possível hipótese seria de que alguns efeitos mais sutis dos genes FGFR2 e FGFR3 na base do crânio e no crescimento maxilar poderiam resultar numa Classe III esquelética.

O marcador D7S503 está localizado junto ao gene TWIST, em 7p21.2. Esse gene também está relacionado à etiologia da síndrome de Saethre-Chotzen e às craniosinostoses. Na realidade, parece haver uma interação entre este e os genes FGFR durante o desenvolvimento das malformações do crânio e da face (Kress *et al.*, 2006).

## ***II Proposição***

O objetivo deste estudo foi realizar uma análise de ligação paramétrica em 10 famílias brasileiras com história de segregação autossômica dominante do prognatismo mandibular, usando seis marcadores do tipo microssatélites - D1S234, D4S3038, D6S305, D7S503, D10S1483 e D19S884 - localizados próximos a regiões candidatas.

### **III Material e Métodos**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília (CEP-UnB) e o Comitê Nacional de Ética em Pesquisa aprovaram o protocolo deste estudo. Todos os pacientes e familiares analisados assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para poderem participar do projeto (ANEXO 1).

#### **Amostragem**

Para os cálculos gerais de probabilidades, antes de realizar a análise de ligação propriamente dita, deve-se lançar mão de simulações para avaliar a eficácia do estudo. O programa SIMLINK (*SIMLINK software package*) (Ploughman e Boehnke, 1989) fez os cálculos necessários para o conjunto de heredogramas coletados, que continham o fenótipo estudado e a referência de quais membros tinham sido genotipados, com o objetivo de avaliar qual ou quais famílias tinham probabilidade de serem informativas para a análise de ligação.

Dessa maneira, as famílias onde seria mais provável encontrar evidências de ligação puderam ser identificadas, assim como os indivíduos que tinham mais probabilidade de ser os mais informativos. A simulação com a replicação dos heredogramas sob as hipóteses de ligação foi feita usando os mesmos parâmetros de frequência alélica, penetrância e *status* fenotípico dos dados reais.

A avaliação foi também baseada nas análises cefalométricas, exames clínicos, modelos ortodônticos e/ou fotografias faciais e intra-bucais.

Da amostra utilizada previamente na análise de segregação contendo 55 famílias coletadas a partir de probandos afetados com prognatismo mandibular, foram então recrutados 42 indivíduos afetados pertencentes a 10 famílias. Os heredogramas escolhidos (famílias 4, 10, 19, 25, 33, 35, 37, 43, 51 e 54) foram aqueles que mostraram um número elevado de indivíduos afetados e um padrão de herança autossômico dominante (ANEXO 2). Todos os heredogramas tinham no mínimo três gerações, pois desta maneira é mais fácil ter informações diretas sobre a fase dos indivíduos (Rao e Province, 2001).



Os familiares selecionados para a genotipagem foram esclarecidos com relação à pesquisa e caso aceitassem participar, eram chamados para que fossem tomadas as providências necessárias. Os *status* fenotípicos de cada probando e familiar afetado já haviam sido comprovados anteriormente para o estudo de segregação.

Os dados cefalométricos dos 42 indivíduos distribuídos nas 10 famílias podem ser vistos na Tabela I. As medidas cefalométricas ajudaram na determinação do *status* de afetado ou não de cada indivíduo, não só como medidas quantitativas da discrepância sagital, mas também como indicadores qualitativos para determinar os indivíduos mínima ou moderadamente afetados.

### Extração de DNA

O DNA total foi isolado de células do sangue. O sangue venoso coletado foi separado em plasma, fração leucocitária e eritrócitos. Os eritrócitos receberam um tratamento especial com glicerol antes de ser estocado (ANEXO 3). Para a extração do DNA, foi utilizado o método “*Salting out*”, modificado por Miller et al (1988) (ANEXO 3). O DNA foi quantificado em gel de agarose 1% (ANEXO 3) e depois todas as amostras foram diluídas para uma concentração de 20ng/μl.

**TABELA I** – Dados cefalométricos dos 42 indivíduos analisados para os marcadores genéticos situados próximos a regiões genômicas candidatas ao prognatismo mandibular.

Família	Indivíduo	Idade	SNA	SNB	ANB	Po-ENA	Go-Gn	SNGoGn	Ângulo Goníaco
4	18*	47a11m	83	84	-1	105	102	44	135
4	22	36a3m	83	84	-1	86	86	36	142
4	32	15a2m	79	80	-1	82	85	41	137
4	34	12a1m	77	80	-3	85	88	50	145
4	35	4a10m	78	79	-1	74	65	34	132
4	36	9a1m	75	77	-2	77	78	42	133
10	10	55a11m	80	82	-2	85	87	41	136
10	23*	29a10m	85	86	-1	91	92	40	138
19	11	42a3m	86	87	-1	100	94	29	135
19	18	6a9m	85	86	-1	90	80	27	133
25	13	80a0m	80	86	-6	90	87	27	130
25	22	55a11m	87	90	-3	88	85	25	129

Família	Indivíduo	Idade	SNA	SNB	ANB	Po-ENA	Go-Gn	SNGoGn	Ângulo Goníaco
25	37	39a2m	83	86	-3	89	85	24	131
25	58	11a2m	80	81	-1	84	78	37	135
33	13	72a0m	83	85	-2	86	85	32	133
33	40	45a7m	82	84	-2	97	89	31	136
33	57	27a10m	78	79	-1	82	80	35	127
33	69	12a9m	78	81	-3	78	78	35	130
35	16	54a2m	74	75	-1	79	79	39	125
35	28	19a1m	82	83	-1	92	84	36	130
35	29	16a5m	73	77	-4	82	77	49	134
37	23	44a10m	91	94	-3	104	83	13	130
37	40	19a6m	79	81	-2	98	89	32	126
37	41*	23a6m	82	84	-2	97	82	32	137
43	52	38a11m	81	84	-3	94	92	35	137
43	54	36a11m	80	82	-2	85	81	39	137
43	62	39a2m	81	83	-2	85	75	38	136
43	81	16a0m	81	82	-1	93	81	35	131
43	83	27a4m	82	84	-2	87	80	34	132
43	84	16a11m	78	77	-1	84	77	25	125
43	86	13a7m	78	79	-1	82	82	45	135
51	14	39a9m	75	77	-2	94	93	39	136
51	18	38a9m	77	78	-1	81	78	44	134
51	28	17a11m	85	88	-3	93	92	32	134
51	29	16a10m	78	80	-2	89	82	37	129
54	15	56a6m	86	89	-3	90	84	24	134
54	16	48a6m	80	81	-1	85	77	37	135
54	21	58a3m	76	77	-1	85	70	43	144
54	23	58a3m	81	82	-1	90	80	41	148
54	50	25a4m	76	79	-3	82	81	32	129
54	51	21a4m	82	85	-3	89	92	30	125
54	52	19a8m	83	85	-2	90	94	31	128

\*dados da avaliação cefalométrica pós-cirúrgica ortognática

### Marcadores Genéticos Utilizados

Seis iniciadores para marcadores polimórficos bem documentados no *GenBank* foram escolhidos para serem analisados nessa amostra (TABELA II). Esses marcadores

foram escolhidos em função de sua heterozigose e pela sua ligação ou proximidade com regiões candidatas à Classe III esquelética indicadas por trabalhos prévios (Jacob *et al.*, 2006; Rump *et al.*, 2006; Freitas *et al.*; 2006; Stevens e Roeder, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2004; Yoshida *et al.* 2004). O processo de purificação foi feito pelo método de dessalinização e foi realizada uma diluição para se ter uma solução de trabalho com uma concentração de 10 $\mu$ M (ANEXO 3).

Todos os iniciadores *forward* foram marcados com fluoróforos de cores diferentes, de acordo com o tamanho do produto da PCR. O objetivo foi facilitar a leitura dos resultados de genotipagem, pois, dessa maneira, os picos dos marcadores que apresentassem coincidência no número de pares de base poderiam ser distinguidos facilmente. Assim sendo, foram usados os fluoróforos 6-FAM (azul) para os marcadores D4S3038, D6S1689 e D19S566, HEX (verde) para o D1S234 e D7S503 e NED (amarelo) para o D10S1483-F NED (130-158pb).

**TABELA II:** Características dos marcadores genéticos do tipo microssatélites com repetições de dinucleotídeos utilizados na análise de ligação gênica.

<i>Locus</i>	<i>Localização</i>	<i>Gene candidato</i>	<i>Iniciadores utilizados</i>	<i>Tamanho do produto (pb)</i>	<i>Código GenBank</i>
<b>D1S234</b>	1p36. 11	RUNX3 (1p36)	<i>Forward:</i> GCCAGGAGGTTGAGG <i>Reverse:</i> AAGGCAGGCTTGAATTACAG	226-238	Z16889
<b>D4S3038</b>	4p16. 3	FGFR3	<i>Forward:</i> GAAGACCAGCATTTCGG <i>Reverse:</i> GGTTTAATACACAGTAATTGTTCA	207-229	Z51777
<b>D6S1689</b>	6p21	RUNX2 (CBFA1) (6p21)	<i>Forward:</i> AGTTGTTTTGATGNCCAGG <i>Reverse:</i> AGCTCTCCTACTTCTAGCAGATGAC	279-319	Z51650
<b>D7S503</b>	7p21. 2	TWISTT1	<i>Forward:</i> CTTGGAGTAATGGGAGCAG <i>Reverse:</i> TCCCTGAAAACCTTTAATCAG	279-319	Z51750
<b>D10S1483</b>	10q26	FGFR2	<i>Forward:</i> CAATGCTATCCCGGCTATG <i>Reverse:</i> TCAAGACTGCAAGCGTGT	130-158	Z52448
<b>D19S566</b>	19p13. 1	COMP (19p13.2)	<i>Forward:</i> AGCTTCAGAGGCCATAGC <i>Reverse:</i> CAGGTAGGGCTGGAATGTT	139-169	Z52152

## Reações de PCR (*Polymerase Chain Reactions*)

Os seis microssatélites foram amplificados separadamente e analisados juntos em um seqüenciador automático ABI377. As reações foram realizadas com um volume final total de 12,5µl, contendo 40 ng de DNA genômico, 0,3µM de cada iniciador (*forward* e *reverse primers*), 0,250 mmol de dNTPs, 1 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidade de Taq polimerase e tampão de amplificação 1X. As amplificações dos marcadores D1S234 e D10S1483 foram realizadas em termociclador com um passo inicial a 95°C por 5 minutos, 29 ciclos de 94°C por 1 min, 51°C por 1 min, 72°C por 1 min e um passo adicional de extensão a 72°C após a finalização dos ciclos por 30'. Para os demais *loci*, o programa da PCR variou de acordo com a temperatura de pareamento dos iniciadores que foram de 50°C, 53°C, 53°C e 52°C para os marcadores D4S3038, D6S1689, D7S503 e D19S566 respectivamente.

## Verificação de amplificação

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo para verificação de amplificação. Foram aplicados 5 µl de cada produto de PCR e 3 µl de tampão de carregamento em cada poço. A eletroforese foi de cerca de 45' com 100V de corrente. As bandas foram avaliadas e fotografadas sob luz ultravioleta. Todas as amplificações que não obtiveram sucesso e/ou apresentavam um padrão inadequado de bandas foram repetidas.

## Genotipagem

Para genotipagem, 2µl dos produtos de amplificação dos seis marcadores para cada indivíduo foram transferidos para microtubos de polipropileno e homogeneizados. 1µl dessa mistura foi transferida para outro microtubo onde foram adicionados 0,8µl de Rox (marcador) e 3,2µl de tampão de carregamento com formamida. A mistura final foi desnaturada, 1µl foi aplicado em gel de poliacrilamida e a eletroforese foi realizada em um seqüenciador ABI *prism 377* (*Perkin Elmer*). O tempo de eletroforese foi de cerca de 2h 30'. Os dados de cada genotipagem foram analisados com a utilização de dois programas de computador: *Genescan* e *Genotyper* (*Perkin Elmer*). É importante ressaltar que as informações nessa etapa foram analisadas independentemente do conhecimento da estrutura do heredograma.

Após a conclusão da coleta dos dados de genotipagem foi realizada uma checagem dos genótipos encontrados para cada indivíduo, dessa vez utilizando as informações de cada heredograma, no intuito de encontrar inconsistências de herança mendeliana. As inconsistências encontradas foram solucionadas com a repetição da genotipagem para aquelas amostras determinadas ou, em caso de impossibilidade de repetição por qualquer motivo, através da exclusão dos indivíduos da análise.

### **Análise de Ligação**

A análise de segregação prévia indicou um padrão de herança autossômico dominante para o prognatismo mandibular nesse conjunto de famílias, entretanto, a presença de muitos portadores obrigatórios não afetados sugeriu que um modelo com penetrância reduzida seria o mais apropriado.

Desta maneira, foi feita uma análise de ligação paramétrica, com uma penetrância ajustada para 90% para um padrão de herança autossômico dominante e uma frequência de 1% para os alelos do gene principal. Essa frequência alélica foi extrapolada da estimativa de aproximadamente 2% de prevalência do prognatismo mandibular. A estimativa da prevalência foi baseada na prevalência estimada para as populações parentais brasileiras (Martins, 1994).

A análise realizada foi do tipo dois pontos, avaliando os *Lod scores* sobre um conjunto de valores de  $\theta$  usando o programa MLINK (Lathrop e Lalouel, 1984) como implementado no pacote FASTLINK, versão 3.0 (Cottingham *et. al.*, 1993).

O programa gerou um grande número de possíveis conjuntos de dados de marcadores para cada família, dado o número de alelos, suas frequências, um valor postulado de  $\theta$  e avaliou os *Lod scores* para cada conjunto. Os *Lod scores* médios para cada família ou a probabilidade que o LOD fosse maior que 3 (ou qualquer outro valor), pôde ser obtida e utilizada para avaliar a inclusão ou exclusão de ligação nessas famílias para os marcadores selecionados.

Teoricamente, as amostras avaliadas seriam suficientes para mostrar ligação significativa (LOD = +3,4) ao *locus* principal para o prognatismo mandibular nessas famílias se o marcador polimórfico estivesse essencialmente na mesma localização do *locus* ( $\theta$  igual a zero). Seriam suficientes para mostrar uma indicação de ligação (LOD = +2,3), se  $\theta$  fosse igual a 0,05, com o marcador polimórfico 5 cM ou aproximadamente 5 milhões de pares de bases afastado do *locus* principal em uma direção ou na outra.

Em caso de ausência de ligação, áreas de exclusão foram calculadas em ambas as direções a partir do *locus* do marcador, baseado no valor do *Lod score* para cada valor de  $\theta$ .

## IV Resultados

Os resultados da genotipagem para os seis marcadores microssatélites para os 42 indivíduos selecionados estão apresentados TABELA III. Os valores de *Lod scores* estimados para cada marcador, em cada uma das famílias, para um conjunto de valores para  $\theta$  podem ser vistos no Anexo 4. Na TABELA IV estão apresentados os *Lod scores* para o conjunto das 10 famílias analisadas. Os dados indicaram que, nas famílias estudadas, não houve evidência de ligação para cinco dos marcadores avaliados a um *locus* do prognatismo mandibular. Para o *locus* D4S3038, com os dados observados, não se pode concluir ou excluir que haja ligação.

Para o marcador D1S234, o LOD foi -15,84 para um  $\theta$  de zero. Também não houve evidência de ligação até um  $\theta$  de 0,1 (LOD igual a -3,28). Esses resultados criam uma área de exclusão para um *locus* dominante de prognatismo mandibular em uma região de 10cM do D1S234 em ambas as direções, no conjunto de famílias avaliadas.

Com relação ao D4S3038, o LOD estimado foi de -1,44 para um  $\theta$  de zero, aumentando para 0,44 com um valor de  $\theta$  igual a 0,1. Não houve área de exclusão pois poucas famílias mostraram ser informativas para esse marcador em particular.

No caso de D6S1689, o LOD foi -7,06 para um  $\theta$  de zero. A região excluída foi de pouco mais de 1 cM para cada lado do marcador.

Já para o marcador D10S1483, o LOD ficou em -7,73 para um  $\theta$  de zero. Esse resultado exclui ligação ao FGFR2 e outros genes em uma área de 1cM do marcador para ambos os lados.

Para D7S234, o LOD foi -8,94 para um  $\theta$  de zero. Também não houve evidência de ligação até um  $\theta$  de 0,01 (LOD igual a -3,77), excluindo genes em uma região que se estende aproximadamente 2,5 cM do D7S234 em ambas as direções.

Os dados de todas as famílias analisadas indicaram que não há evidências de ligação do D19S566 ao *locus* da Classe III, com um valor de LOD igual a -9,21 para um  $\theta$  de zero. Não há evidência de ligação até um valor de  $\theta$  igual a 0,01 (LOD igual a -4,71), excluindo uma região de aproximadamente 4 cM em ambas as direções a partir do marcador.



**TABELA III** – Genótipos dos 42 indivíduos para os seis microssatélites analisados (D1S234, D4S3038, D6S1689, D7S503, D10S1483 e D19S566).

Família	Indivíduo	Genótipos											
		D1S234		D4S3038		D6S1689		D7S503		D10S1483		D19S566	
4	18	226	236	207	209	307	311	148	180	130	144	145	157
4	22	226	236	207	221	307	327	148	180	142	144	145	157
4	32	230	236	207	221	307	307	148	170	130	136	145	159
4	34	226	228	207	221	311	311	148	174	130	144	145	157
4	35	226	226	207	221	277	327	180	180	130	142	145	155
4	36	226	226	207	221	307	307	148	174	130	142	145	157
10	10	232	236	225	225	311	311	170	172	142	146	161	165
10	23	226	232	207	225	311	311	170	172	142	146	159	161
19	11	230	234	219	223	289	291	170	172	148	150	141	153
19	18	226	230	209	219	289	313	170	172	142	150	141	159
25	13	230	234	219	219	291	311	170	180	130	146	153	161
25	22	230	236	219	219	309	311	148	170	130	146	153	155
25	37	234	236	207	219	309	311	148	170	130	144	155	161
25	58	226	236	211	219	311	311	148	180	130	144	161	161
33	13	226	230	219	219	311	311	158	168	130	130	155	159
33	40	226	230	203	219	293	311	168	168	130	130	155	167
33	57	226	236	219	221	311	311	156	170	148	152	145	159
33	69	226	236	203	219	311	311	156	168	130	144	155	167
35	16	224	230	219	219	311	311	168	180	140	140	157	168
35	28	224	228	219	223	311	311	180	180	140	140	157	157
35	29	228	230	219	223	311	311	172	180	140	144	157	168
37	23	228	232	207	223	279	311	162	170	144	144	159	165
37	40	228	234	219	223	287	311	162	162	132	144	155	159
37	41	226	232	219	223	287	311	162	162	142	144	155	159
43	52	224	226	207	221	311	311	148	180	130	156	161	163
43	54	224	226	219	221	299	311	148	180	140	140	161	163
43	62	230	236	207	221	311	311	150	170	130	156	161	161
43	81	224	228	217	221	299	311	148	180	130	156	155	161
43	83	224	228	217	221	299	311	148	180	130	144	159	161
43	84	226	238	219	219	291	299	148	180	140	140	163	163
43	86	230	238	219	221	299	299	180	180	130	148	145	161
51	14	226	232	219	223	311	315	170	180	130	156	141	157
51	18	226	226	219	219	311	311	170	172	130	144	145	161
51	28	226	232	219	223	311	311	170	180	130	144	141	145
51	29	226	232	219	223	311	311	170	172	130	144	141	145

Família	Indivíduo	Genótipos											
		D1S234		D4S3038		D6S1689		D7S503		D10S1483		D19S566	
54	15	230	236	221	223	311	311	170	180	138	142	157	161
54	16	226	228	209	223	293	307	148	170	124	130	157	165
54	21	226	228	209	223	293	311	148	162	124	144	159	165
54	23	226	230	211	223	277*	277*	170	172	124	144	165	165
54	50	228	236	209	221	293	311	170	180	130	142	157	161
54	51	226	230	209	221	307	311	148	180	124	138	157	165
54	52	226	236	209	221	307	311	148	180	130	142	157	165

\*Amostra descartada devido a inconsistência no padrão de herança mendeliano e impossibilidade de repetição da genotipagem.

**TABELA IV** – *Lod scores* resultantes da análise de ligação de seis marcadores microsatélites (D1S234, D4S3038, D6S1689, D7S503, D10S1483 e D19S566) com o *locus* do prognatismo mandibular para o conjunto das famílias brasileiras analisadas para um conjunto de valores para  $\theta$ . Os valores em negrito indicam as áreas de exclusão de acordo com  $\theta$ .

Marcador	Valores de $\theta$							
	0,0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	
<b>D1S234</b>	<b>-15,84</b>	<b>-9,04</b>	<b>-5,12</b>	<b>-3,28</b>	-1,57	-0,73	-0,25	
<b>D4S3038</b>	-1,44	-0,17	0,35	0,44	0,31	0,11	-0,01	
<b>D6S1689</b>	<b>-7,06</b>	<b>-3,54</b>	-1,15	-0,24	0,34	0,37	0,20	
<b>D7S503</b>	<b>-8,94</b>	<b>-3,77</b>	-1,39	-0,51	0,03	0,10	0,05	
<b>D10S1483</b>	<b>-7,73</b>	<b>-1,90</b>	-0,63	-0,20	0,07	0,11	0,06	
<b>D19S566</b>	<b>-9,21</b>	<b>-4,71</b>	-1,94	-0,89	-0,19	-0,02	0,00	

## V Discussão

A população brasileira foi formada basicamente por uma mistura de povos europeus, africanos e ameríndios, fato amplamente comprovado por dados históricos e genéticos. A contribuição asiática para a formação da população brasileira é negligenciável. Por essa razão, a ausência de ligação dos *loci* D1S234, D6S305 e D19S884 ao *locus* do prognatismo mandibular, os mesmos que mostraram evidências de ligação nas famílias japonesas e coreanas (Yamaguchi *et al.*, 2005), pode refletir as diferenças existentes entre a população brasileira e a asiática no que se refere aos fatores etiológicos que levam ao prognatismo mandibular. Porém, os resultados encontrados podem também indicar não somente uma heterogeneidade genética, como também podem ser reflexo de uma heterogeneidade no desenho dos dois estudos e nos critérios de escolha do fenótipo.

Os outros três *loci* testados (D4S3038, D7S503 e D10S1483) estão mais relacionados a genes que poderiam levar a um quadro de Classe III esquelética devido ao retrognatismo maxilar. Como em nossa amostra, buscaram-se casos de Classe III esquelética em função de prognatismo mandibular, tal diferença pode explicar a ausência de evidências de ligação. Como a literatura relata que, muitas vezes o retrognatismo maxilar e o prognatismo mandibular são difíceis de serem dissociados, pois o crescimento das duas bases ósseas ocorre de forma interdependente (Singh *et al.*, 1998<sup>a</sup>; Singh *et al.*, 1998<sup>b</sup>), testar marcadores ligados a genes candidatos ao retrognatismo maxilar se justifica.

Uma maneira de resolver o problema das replicações em doenças complexas é fazer uma meta-análise com o *pool* dos resultados dos estudos de ligação (Teare e Barret, 2005; Rao e Province, 2001). Entretanto, a meta-análise funciona melhor quando os estudos são feitos sob condições homogêneas, quando os fenótipos são medidos com os mesmos critérios e quando as análises estatísticas são similares (Rao e Province, 2001).

Em geral, o fracasso na replicação de um estudo pode ter várias possíveis razões: o estudo original pode ser um falso positivo, a amostra de replicação não teve potencial suficiente (falso negativo), o estudo de replicação foi baseado numa população diferente da usada no estudo original, pode haver heterogeneidade de *locus* ou simplesmente pode

ser uma consequência estatística de se tentar mapear vários genes envolvidos em uma característica oligogênica (Rao e Province, 2001).

Deve-se lembrar que um traço característico de algumas características complexas é o fato de serem oligogênicas ou poligênicas. A presença de um gene principal com grandes efeitos individuais é rara. Por essa razão, métodos geralmente utilizados para detectar esse tipo de gene único podem não ser os mais adequados nesses casos, e por isso terem menos probabilidade de sucesso. Em alguns casos, o efeito individual de um gene pode parecer pequeno, mas as interações com outros genes e/ou com o ambiente podem dar uma contribuição substancial na manifestação final da característica. A falha em reconhecer ou entender tais interações podem eventualmente mascarar os efeitos individuais de um gene (Rao e Province, 2001).

A escolha do método de análise, por exemplo, paramétrico ou não-paramétrico, está intimamente associado ao desenho do estudo, que por sua vez representa diferentes filosofias ou suposições sobre a melhor maneira de mapear genes para características como esta. A peça principal que vai levar o investigador a decidir pela análise paramétrica ou não-paramétrica será a análise de segregação. Uma vez encontradas fortes evidências da presença de um gene principal, especialmente se está atuando de forma mendeliana, a análise paramétrica é a que tem maior potencial. Análises não-paramétricas, como a do estudo nas famílias japonesas (Yamaguchi *et al.*, 2005), fazem sentido quando se tem alguma evidência da contribuição genética para a característica, mas a população a ser estudada apresenta poucas famílias com indicativos de transmissão mendeliana.

Em um protocolo típico, o investigador reúne famílias grandes buscando indicativos de que a característica seja transmitida naquelas famílias de forma mendeliana, o que deve ser confirmado por análises de segregação. Caso não haja indicação de transmissão mendeliana, a melhor estratégia será mudar a abordagem e utilizar pares de irmãos afetados (ASP). Assim os mesmos são escolhidos geralmente dentro das próprias famílias já reunidas inicialmente. O problema, nesse caso, é que há uma exigência de que o número de indivíduos genotipados seja muito maior que o exigido em análises paramétricas. No trabalho de Yamaguchi *et al.* (2005), foram usados somente 90 pares de irmãos afetados, o que representa uma quantidade muito pequena quando se trata de um escaneamento do genoma total em busca de um gene para uma característica complexa, onde geralmente centenas de ASPs são necessários.

Nem sempre a genotipagem da amostra completa se faz necessária. Pelo contrário, a maioria dos estudos, em um primeiro momento, realiza a genotipagem apenas dos indivíduos afetados. Se os resultados forem promissores, estendem a análise para o restante. Essa estratégia foi inicialmente sugerida para análises de ligação que trabalham com pares de irmãos afetados (Holmans & Craddock, 1977) e posteriormente para os estudos de associação (Sham, 1994; Sobell *et al.*, 1993). A vantagem é basicamente a redução dos altos custos de genotipagem para um grande número de marcadores requeridos no estágio inicial, deixando para explorar o potencial da amostra completa apenas nos estágios mais tardios, caso seja indicado.

Se a análise de segregação for favorável, como no caso aqui apresentado, o indicado é realizar análise de ligação paramétrica. Essa análise utiliza todas as informações disponíveis na estrutura total dos heredogramas, usando cada par afetado que ocorra (pares de irmãos, primos, avós/netos, etc). Esse método também tem a vantagem de ser capaz de excluir as regiões ao redor dos marcadores com evidência negativa de ligação à presença de genes principais dominantes.

Com a presente amostra era possível realizar uma análise não paramétrica para os dez heredogramas. Porém, ao contrário da abordagem paramétrica, não se poderia tirar nenhuma conclusão a partir desses resultados, pois o baixo valor dos LODs poderia ser devido tanto à ausência do gene quanto em função da falta de potencial para detectar ligação no pequeno número de famílias, quando comparada com as centenas de pares de familiares de um estudo clássico.

As abordagens paramétricas, como a executada pelo programa MLINK (Lathrop e Lalouel, 1984), assumem um modo de transmissão, no caso específico autossômico dominante, que vai determinar algumas expectativas: pais afetados devem passar o alelo da característica e o fenótipo de afetado para a metade de seus filhos, indivíduos que não herdarem o alelo da característica não o passarão aos seus filhos, dentre outras. O programa então analisa os dados genotípicos e fenotípicos através de todo o heredograma para verificar se estão consistentes com tal padrão e com a presença do gene da característica próximo do marcador testado. O *Lod score* é a medida de adequação ao padrão, sendo que um valor negativo indica que o mais provável é que o *locus* do marcador avaliado esteja longe do *locus* da característica de interesse.

Os métodos não paramétricos partem da presunção genética geral de que parentes afetados devem compartilhar material genético nas proximidades do gene da

característica. Essa abordagem é muito menos específica, mas a vantagem é que se pode detectar um gene com um modo de transmissão não óbvio nas avaliações de heredogramas e nas análises de segregação. O problema é que muitos indivíduos a mais são necessários para detectar um gene através dessa abordagem. O que se faz é descartar parte do potencial para detectar a ligação ao reduzir o interesse pelo compartilhamento de alelos entre familiares e ignorar as informações dos heredogramas a respeito da origem daqueles alelos.

O principal e mais importante pré-requisito para se ter sucesso em um mapeamento de ligação é um conjunto de famílias nas quais tanto haja a segregação do fenótipo a ser estudado, como também a avaliação desse fenótipo seja a menos ambígua possível (Rao e Province, 2001). A determinação da ligação é fundamentalmente um processo estatístico e incertezas introduzidas pela confusão acerca do *status* dos membros afetados podem levar a algum distúrbio nos resultados ou mesmo obscurecer completamente qualquer sinal de ligação. Onde há erros na seleção dos marcadores, erros de diagnóstico, grande heterogeneidade, heranças complexas ou presença de muitas fenocópias – particularmente quando resultam na inclusão de indivíduos com doenças diferentes ou até sem a doença no grupo dos afetados – as análises de ligação podem falhar mesmo nas amostras muito grandes (Botstein e Risch, 2003; Rao e Province, 2001).

Algumas características ou doenças apresentam um fenótipo bem definido. Para essas características mendelianas simples, basta identificar indivíduos afetados e não-afetados. Entretanto, para outras doenças, a situação é mais problemática. O diagnóstico definitivo geralmente depende de vários sintomas distintos e nem sempre há um consenso a respeito. A ausência de uma definição clara do fenótipo pode gerar dúvidas em relação à classificação do *status* fenotípico e gerar inconsistências em potencial.

A utilização de características quantitativas pode auxiliar a contornar essa dificuldade. Por exemplo, a presença de distintos sintomas pode ser usada como uma medida da gravidade da doença. Por outro lado, é possível transformar uma característica quantitativa em uma característica binária. Por exemplo, um indivíduo pode ser classificado como portador de prognatismo mandibular se o seu ângulo ANB for negativo e como não portador se o valor desse ângulo for zero ou positivo. No entanto, simplificar uma característica quantitativa, transformando-a em um fenótipo

binário pode resultar em perda de eficácia se um limiar inapropriado é usado (Teare e Barret, 2005).

O fato de que o padrão de herança do prognatismo mandibular nas famílias avaliadas é consistente com a presença de um gene principal não significa necessariamente que somente um gene principal esteja segregando nas famílias. Existem muitos exemplos de doenças causadas por mutações herdadas em diferentes genes. Algumas mutações dão origem às mesmas doenças, mas com diferentes modelos genéticos. Por exemplo, a doença de Charcot-Marie-tooth apresenta diferentes padrões de herança (autossômico recessivo, dominante e ligado ao X) e mutações em mais de 10 genes são responsáveis pelas suas diferentes formas (Kochanski, 2006).

Esse tipo de heterogeneidade de *locus* pode afetar seriamente o potencial de uma análise de ligação paramétrica. A solução mais comum é assumir que as mutações nos genes relacionados à doença são tão raros que cada família estará ligada a um único gene. Podem também existir outros genes produzindo o mesmo fenótipo, de modo que enquanto em algumas famílias pode estar segregando um determinado gene ligado ao marcador que está sendo estudado (todos apresentando essencialmente a mesma fração de recombinação), em outras famílias o fenótipo pode ser devido a outros genes não ligados (Thomas, 2004).

A heterogeneidade de *locus* para uma série de doenças têm sido investigada. Foi demonstrado que um número muito maior de famílias é necessário para detectar ligação quando os dados são heterogêneos do que o necessário para os homogêneos e ainda maior para detectar a heterogeneidade (Teare e Barret, 2004; Rao e Province, 2001; Durner e Greenberg, 1992). A heterogeneidade é ainda mais difícil de ser demonstrada quando a penetrância do fenótipo ligado é baixa (Durner e Greenberg, 1992).

Como já comentado, evidências de ligação ao prognatismo mandibular nos cromossomos 1, 6 e 19 foram encontradas para famílias japonesas e coreanas (Yamaguchi *et al.* 2005). Em geral ambas as populações mostraram padrões similares de ligação, mas algumas discrepâncias foram observadas. A avaliação dos pares de irmãos afetados (ASP) nas famílias coreanas mostrou ligação ao prognatismo mandibular no cromossomo 4, enquanto que nas famílias japonesas, os resultados apontaram ligação para os cromossomos 9 e 10. Essas discrepâncias podem ter sido causadas pela heterogeneidade genética entre as duas populações, apesar de que erros

devido ao tamanho reduzido das amostras também possam explicar essa discrepância (Yamaguchi *et al.*, 2005).

Geralmente, quando o fenótipo de interesse é uma doença ou malformação que requeira registro e/ou tratamento clínico, as famílias escolhidas são coletadas via especialistas clínicos. Se por um lado, essa forma de averiguação pode causar alguns problemas na análise de segregação, por outro lado é um fator importante para reduzir a heterogeneidade fenotípica nas análises de ligação, pois especialistas clínicos são capazes de aplicar rigorosos critérios de seleção das famílias, direcionados no sentido de maximizar a eficácia e reduzir a heterogeneidade (Teare e Barret, 2005).

Outros métodos para reduzir a heterogeneidade de *locus* incluem a limitação da análise a sub-grupos estritamente definidos da característica estudada, onde um componente genético único e mais forte possa estar presente. Os vários sub-grupos de uma mesma característica ou doença podem ser causados por componentes genéticos diferentes (Bui *et al.* 2006; Rao e Province, 2001). Uma forma de se conseguir uma amostra grande o suficiente para permitir a sua divisão em vários sub-grupos relativamente mais homogêneos é através da reunião dos dados de vários estudos homólogos de uma mesma doença, desde que a metodologia empregada seja a mesma para todos eles (Rao e Province, 2001).

Alguns autores recomendam que os estudos genéticos do prognatismo mandibular devam levar em consideração os cinco diferentes sub-grupos existentes para esse fenótipo (Bui *et al.*, 2006). Mas, nem sempre é fácil fazer essa divisão, pois em nossa amostra notou-se a presença de mais de um sub-grupo de prognatismo mandibular dentro de uma mesma família. Além disso, a separação do conjunto de famílias em subgrupos distintos poderia causar problemas posteriores ao se tentar extrapolar os resultados de ligação encontrados nos subgrupos para a população geral. Por exemplo, um estudo que encontra que na metade de um bem selecionado grupo de famílias uma doença está ligada a um *locus* específico pode não ser capaz de prever a proporção de casos dessa doença, na população geral, que esteja ligada a esse *locus* (Teare e Barret, 2005).

Uma das principais razões para o limitado sucesso nas análises de ligação para características complexas é que os estudos são muito pequenos para tentar detectar genes de efeito modesto (Teare e Barret, 2005; Rao e Province, 2001). Para decifrar os efeitos dos genes e assim auxiliar no melhor entendimento dos componentes genéticos



para uma dada característica, deve-se prestar atenção a todos os aspectos relevantes desse processo de busca, incluindo o desenho do estudo, ótimos métodos de análise e interpretação dos resultados (Rao e Province, 2001). Por exemplo, A interpretação de achados aparentemente negativos depende crucialmente do potencial do estudo. O tamanho da amostra e os possíveis erros nos genótipos afetam o potencial do estudo. Com heredogramas grandes, os erros nos genótipos são mais fáceis de serem detectados, pois tais erros levam a inconsistências mendelianas dentro das famílias, mas quando apenas ASP ou pares de familiares afetados são genotipados, sem nenhum outro dado familiar, genótipos incorretos podem passar despercebidos (Teare e Barret, 2005).

## **VI Conclusão**

Os resultados da análise de ligação mostraram não haver indicativo de ligação para cinco dos marcadores avaliados (D1S234, D6S1689, D7S503, D10S1483 e D19S566) com o *locus* do prognatismo mandibular. Quanto ao marcador D4S3038, não foi possível incluir ou excluir ligação pois poucas famílias foram informativas para esse *locus*.

A ausência de evidências de ligação pode ser explicada em função da conhecida heterogeneidade clínica e genética do fenótipo. Foram identificadas regiões de exclusão para o *locus* do prognatismo mandibular ao redor de *loci* de cinco dos marcadores nas famílias analisadas e essa informação é muito importante pois exclui essas áreas de futuros estudos de ligação. A inclusão futura de novos membros das famílias estudadas na análise pode ser de grande ajuda, particularmente se um escaneamento do genoma completo de cada membro familiar selecionado puder ser realizado, com a utilização de um maior número de marcadores.

**CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS**

## **Conclusões gerais e perspectivas futuras**

Os últimos dez anos têm sido marcados por grandes avanços na compreensão das características moleculares das doenças mendelianas humanas. O recente sequenciamento do DNA humano e a descoberta das variações que podem existir farão com que os trabalhos avancem ainda mais na próxima década. Há esperança de que a melhora nos métodos de genotipagem e o desenvolvimento de estratégias de estudos cada vez mais criteriosas possam levar a genética de fenótipos complexos até ao mesmo nível em que se encontra hoje a genética mendeliana (Botstein e Risch, 2003). Afinal de contas, para as mais complexas características, a questão não é se há genes, mas sim quando e como eles serão encontrados (Rao e Province, 2001). A identificação de genes que podem estar implicados na etiologia das doenças complexas explica apenas parcialmente os caminhos biológicos que levam à doença. O quadro só estará completo após se conhecer a expressão dos genes e a função de cada produto gênico, assim como o papel do DNA, RNA e das proteínas no ambiente vivo de um organismo integrado (Burton *et al.*, 2005).

A avaliação dos heredogramas e a análise de segregação aqui realizados indicou que há fortes evidências de um gene principal determinando o acometimento do prognatismo mandibular nas famílias estudadas, com um padrão de herança mendeliano, de carácter principalmente dominante, com penetrância incompleta. Sugere-se a existência de fatores ambientais e a ação de genes secundários (componentes multifatoriais), mas não é possível quantificá-los ou discriminar o papel de cada um deles, nem dizer qual ou quais são os responsáveis pela penetrância incompleta do gene principal.

Os resultados da análise de ligação mostraram não haver indicativo de ligação de nenhum dos marcadores avaliados (D1S234, D6S1689, D7S503, D10S1483 e D19S566) com o *locus* do prognatismo mandibular, sendo que para o marcador D4S3038 não foi possível incluir ou excluir ligação pois poucas famílias foram informativas para esse *locus*. A ausência de evidências de ligação pode ser explicada em função da conhecida heterogeneidade clínica e genética do fenótipo. Foram identificadas regiões de exclusão para o *locus* do prognatismo mandibular ao redor dos *loci* dos marcadores nas famílias analisadas. A inclusão futura de novos membros das famílias estudadas na análise pode ser de grande ajuda, particularmente se um

escaneamento do genoma completo de cada membro familiar selecionado puder ser realizado, com a utilização de um maior número de marcadores.

Apesar de que a determinação das bases genéticas das maloclusões Classe III esqueléticas possa não ter uma aplicação clínica direta em um futuro imediato, a identificação dos genes suscetíveis nas regiões de ligação irá pavimentar o conhecimento dos caminhos da genética molecular e ajudar no desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas, melhorando o controle clínico sobre os pacientes. Apesar da forte sugestão de envolvimento de fatores genéticos no desenvolvimento do prognatismo mandibular, não há ainda dados sobre as suscetibilidades genéticas a essa malformação. A identificação dessas suscetibilidades é o primeiro passo em direção ao entendimento completo de sua patogênese molecular (Yamaguchi *et al.*, 2005).

A identificação desses genes será muito útil no estabelecimento de condutas clínicas preventivas, interceptoras e corretivas mais eficazes. O conhecimento pode ser usado, por exemplo, para prever com exatidão as alterações do crescimento em longo prazo e, conseqüentemente, para estabelecer protocolos de tratamento mais adequados. Além é claro de saber que as descobertas genéticas e moleculares podem direcionar as intervenções farmacológicas. Enfim, como a Ortodontia continua a se desenvolver tanto tecnologicamente como filosoficamente, podemos esperar que avanços nos diagnósticos e planejamentos de tratamento para Classe III são iminentes e inevitáveis (Bui *et al.*, 2006).

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## **Referências bibliográficas**

- ALLWRIGHT, W.C.; BUNDRED, W.H. A survey of handicapping Dentofacial anomalies among Chinese in Hong Kong. **Int Dent J**, v. 14, p. 505-519, 1964.
- ALMASY, L.; BLANGERO, J. Multipoint quantitative-trait linkage analysis in general pedigrees. **Am J Hum Genet**, v. 62, p. 1198-1211, 1998.
- AL-QAWASMI, R.A.; HARTSFIELD, Jr, J.K.; EVERETT, E.T.; FLURY, L.; LIU, L.; FOROUD, T.M.; MACRI, J.V.; ROBERTS, W.E. Genetic predisposition to external apical root resorption in orthodontic patients: linkage of chromosome-18 marker. **J Dent Res**, v.82, n. 5, p. 356-360, 2003.
- ANGLE, E.H. **Treatment of malocclusion of the teeth**. v. 58, 7<sup>th</sup> edition, SS white manufacturing Company, Philadelphia, p. 52-54, 1907.
- ANTONIOU, A.C.; PHAROAH, P.D.; EASTON, D.F.; EVANS, D.G. BRCA1 and BRCA2 cancer risks. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 20, p. 3312-3, 2006.
- ARIENZA, B. Prognatismo mandibular. **Rev Asoc Odont Argent**, v. 59, n. 1, p. 12-17, 1971.
- AST, D.B.; CARLOS, J.P.; CONS, N.C. The prevalence and characteristic of malocclusion among sênior high school students in upstate New York. **Am J Orthod**, v. 51, p. 437-445, 1965.
- AVIS, V. The relation of the temporal muscle to the form of the coronoid process. **Am J Phys Anthropol**, v. 17, p. 99-104, 1959.
- BAILEY, D.W. Genes that affect the shape of the murine mandible. **J Hered**, v. 76, p. 107-114, 1985.
- BEHRENTS, R.G. The biological basis for understanding craniofacial growth during adulthood. **Prog Clin Biol Res**, v.187, p. 307-319, 1985.
- BONNEAUD, C.; PEREZ-TRIS, J.; FEDERICI, P.; CHASTEL, O.; SORCI, G. Major histocompatibility alleles associated with local resistance to malaria in a passerine. **Int J Org Evol**, v. 60, n. 2, p. 383-9, 2006.

- BORECKI, I.B.; PROVINCE, M.A.; RAO, D.C. Power of segregation analysis for detection of major gene effects on quantitative traits. **Genet Epidemiol**, v. 11, n. 5, p. 409-418, 1994.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am J Hum Genet**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BOTSTEIN, D.; RISCH, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nature Genetics**, v. 33. p. 228-237, 2003.
- BUI, C.; KING, T.; PROFFIT, W.; FRAZIER-BOWERS, S. A Phenotypic characterization of Class III patients – A necessary background for genetic analysis. **Angle Orthod**, v. 76, n. 4, p. 564-569, 2006.
- BURTON, P.R.; TOBIN, M.D.; HOPPER, J.L. Series: genetic epidemiology 1. Key concepts in genetic epidemiology. **The Lancet**, v. 366, p. 941-51, 2005.
- CADENAT, H.; AUSSÉNAC, R.; BARTHÉLÉMY, T.; COMBELLES, R. Le maxillaire supérieur, facteur de prognathie inférieur. **Rev de Stomat Chir Maxillofac**. v. 72, n. 4, p. 527-530. 1971.
- CAPELOZZA, L.; MARTINS, A.; MAZZOTINI, R.; DA SILVA, H.G. Effects of dental decompensation on the surgical treatment of mandibular prognathism. **Int J Adult Orthod**, v. 11, p. 165-180. 1996.
- CAVALLI-SFORZA, L.L.; MENOZZI, P.; PIAZZA, A. **The History and Geography of Human Genes**. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1994.
- COTTINGHAM, R.W. Jr.; IDURY, R.M.; SCHAFFER, A.A. Faster sequential genetic linkage computations. **Am J Hum Gen**, v. 53, p. 252, 263, 1993.
- CRAWFORD, P.J.; ALDRED, M.J. X-linked amelogenesis imperfecta – Presentation of two kindreds and a review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 73, p. 449-455, 1992.



- CRUZ, R.M.; BOLOGNESE, A.M. **Crescimento residual da mandíbula em pacientes portadores de maloclusão classe II tratados ortodonticamente.** Tese de Mestrado em Odontologia (Ortodontia), UFRJ, Rio de Janeiro, 1995.
- DAVIDOV, S.; GESEVA, N.; DONVECA, T.; DEHOVA, L. Incidence of prognathism in Bulgária. **Dental abstracts**, v. 6, p. 240, 1961.
- DEMPSTER, W.T.; ADAMS, W.J.; DUDDLES, R.A. Arrangements in the jaws of the roots of the teeth. **J Am Dent Assoc**, v. 67, p. 779-797. 1963.
- DOHMOTO, A.; SHIMIZU, K.; ASADA, Y.; MAEDA, T. Quantitative trait loci on chromosomes 10 and 11 influencing mandible size of SMXA RI mouse strains. **J Dent Res**, v. 81, n. 7, p. 501-504, 2002.
- DOWNS, W.G. Studies in the causes of dental anomalies. **J Dent Res**, v.16, n. 2. p.367-379, 1928.
- DUDBRIDGE, F.; CARVER, T.; WILLIAMS, G.W. Pelican: Pedigree Editor for Linkage Computer Analysis. **Bioinformatics**, 2004.
- DURNER, M.; GREENBERG, D.A. Effect of heterogeneity and assumed mode of inheritance on lod scores. **Am J Med Gen**, v. 42, p. 271-275, 1992.
- EL-GHERIANI, A.A.; MAHER, B.S.; EL-GHERIANI, A.S.; SCIATE, J.J.; ABU-SHAHBA, F.A.; AL-AZEMI, R.; MARAZITA, M.L. Segregation analysis of mandibular prognathism in Lybia. **J Dent Res**, v. 82, n. 7, p. 523-527, 2003.
- ELLIS, E.; MCNAMARA, J.A. Jr. Components of adult class III malocclusion. **J Oral Maxillofac Surg**, v.42, p. 295-305, 1984.
- ENRICH, R.E.; BRODIE, A.G.; BLAYNEY, J.R. Prevalence of Class I, Class II and Class III malocclusions (Angle) in an urban population; an epidemiological study. **J Dent Res**, v. 44, p. 947-953, 1965.
- FIESCHI C. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: defects in the IL-12/IFN $\gamma$  pathway. **Presse Med.**, v. 35, p. 879-86, 2006.
- FOX, R.R.; CRARY, D.D. Mandibular prognathism in the rabbit. **J Hered**, v. 62, n. 1, p. 23-27, 1971.
- FREITAS, E.C.; NASCIMENTO, S.R.; DE MELLO, M.P.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L. Q289P mutation in FGFR2 gene causes Saethre-Chotzen syndrome: some

- considerations about familial heterogeneity. **Cleft Palate Craniofac J**, v. 43, n. 2, p. 142-7, Mar 2006.
- GARNER, L.D.; BUTT, M.H. Malocclusion in black American and Nyeri Kenyans, an epidemiologic study. **Angle Orthod**, v. 55, p. 139-146, 1985.
- GENBANK. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>. Sítio acessado em Julho, 2006.
- GASS, J.R.; VALIATHAN, M.; TIWARI, H.K.; HANS, M.G.; ELSTON, R.C. Familial correlations and heritability of maxillary midline diastema. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 123, p. 35-9, 2003.
- GOLD, J.K. A new approach to the treatment of mandibular prognathism. **Am J Orthod**, v. 35, p. 893-912. 1949.
- GOOSE, D.H.; THOMSON, D.G.; WINTER, F.C. Malocclusion in school children of the West Midlands. **Br Dent J**, v. 102, p. 174-178, 1957.
- GORLIN, R.J.; REDMAN, R.S.; SHAPIRO, B.L. Effect of X-chromosome aneuploidy on jaw growth. **J Dent Res**, v. 44, p. 269-282, 1965.
- GRABB, W.C.; HODGE, G.P.; DINGMAN, R.O.; O'NEAL, R.H. The Habsburg jaw. **Plast. Reconstr Surg**, v. 42, p. 442-445, 1968.
- GUSELLA, J.F. DNA Polymorphism and human disease. **Annu. Rev. Biochem**, v. 55, p-831- 854. 1986.
- HAUSER, E.R.; BOEHNKE, M.; GUO, S.W. Affected sib-pair interval mapping and exclusion for complex genetic traits: sampling considerations. **Gen Epidemi**, v.13, p. 117-137, 1996.
- HELM, S. Prevalence of malocclusion in relation to development of the dentition: an epidemiological study of Danish school children. **Acta Odont Scand**, v. 28, suppl. 58, 1970.
- HOLMANS, P.; CRADDOCK, N. Efficient strategies for genome scanning using maximum- likelihood affected-sib-pair analysis. **Am J Med Gen**, v. 60, p. 657-666, 1997.

- HUANG, C.M.; MI, M.P.; VOGT, D.W. Mandibular prognathism in the rabbit: discrimination between single-locus and multifactorial models of inheritance. **J Hered**, v.72, n. 4, p. 296-298, 1981.
- HUBER, R.E.; REYNOLDS, J.W. A Dentofacial study of male students at the University of Michigan in the physical hardening program. **Am J Orthod**. v. 32, p. 1-21, 1946.
- ISHII, H.; MORITA, S.; TAKEUCHI, Y.; NAKAMURA, S. Treatment effect of combined maxillary protraction and chin cup appliance in severe skeletal Class III cases. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 92, p. 301-312, 2003.
- IWAGAKE, H. Hereditary influence of malocclusion. **Am J Orthod Oral Surg**, v. 24, p. 328-336, 1938.
- JABS, E.W. A Mutation in the homeodomain of the Human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. **Cell**, v. 75, p. 443-450, 1993.
- JACOB, A.L.; SMITH, C.; PARTANEN, J.; ORNITZ, D.M. Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation. **Dev Biol**, v. 11, n. 2, p. 178-82, 2006.
- JACOBSON, A.; EVANS W.G.; PRESTON, C.B.; SADOWSKY, P.L. Mandibular prognathism. **Am J Orthod**, v. 66, p. 140-171. 1974.
- JANSON, G. R. P; CANTO, G. D. L; MARTINS, D. R.; PINZAN, A.; NETO, J. V. Tratamento Precoce da Má Oclusão de Classe III com Máscara Facial Individualizada. **R Dent Press Ortodon Ortoped Facial**, v. 3; n.3; p. 41-51, Maio/Junho, 1998.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p: 67-73. 1985.
- JORGENSEN, R.J. **Mandibular prognathism. In: Birth defects encyclopedia**. Buyse M.L., editor. Cambridge: Blackwell Scientific publications, 1990.
- KANTAROVA, D.; BUC, M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. **Physiol Res**, v. 22, 2006.
- KELBERMAN, D.; TYSON, J.; CHANDLER, D.C.; MCINERNEY, A.M.; SLEE, J.; ALBERT, D.; AYMAT, A.; BOTMA, M.; CALVERT, M.; GOLDBLATT, J.;

- HAAN, E.A.; LAING, N.G.; LIM, J.; MALCOLM, S.; SINGER, S.L.; WINTER, R.M.; BITNER-GLINDZICZ, M. Hemifacial microsomia: progress in understanding the genetic basis of a complex malformation syndrome. **Hum Genet**, v. 109, n. 6, p. 638-45, 2001.
- KERE, J.; SRIVASTAVA, A.K.; MONTONEN, O. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. **Nature Genetics**, v. 13, p. 409-416, 1996.
- KOCHANSKI, A. How to assess the pathogenicity of mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and other diseases? **J Appl Genet**, v.47, n. 3, p. 255-60, 2006
- KONG, A.; COX, N.J. Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. **Am J Genet**, v. 61, p. 1179-1188, 1997.
- KRAUS, B.S.; WISE W.J.; FRIE R.A. Heredity and the craniofacial complex. **Am J Orthod**, v. 45, p.172-217, 1959.
- KRESS, W.; SCHROPP, C.; LIEB, G.; PETERSON, B.; BUSSE-RATZKA, M.; KUNZ, J.; REINHART, E.; SCHAFER, W. D.; SOLD, J. HOPPE. F.; PAHNKE, J.; TRUSEN, A.; SORENSEN, N.; KRAUSS, J.; COLLMANN, H. Saethre-Chotzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. **Eur J Hum Genet**, v.14, n.1, p. 39-48, Jan, 2006.
- KRUGLYAK, L.; LANDER, E.S. Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. **Am J Hum Genet**, v. 57, n.2, p. 439-54, 1995.
- KRUGLYAK, L.; DALY, M.J.; REEVE-DALY, M.P.; LANDER, E.S. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. **Am J Hum Genet**, v. 58, p. 1347-1363, 1996.
- LAINE, M.L.; MORRE, S.A.; MURILLO, L.S.; VAN WINKELHOFF, A.J.; PENA, A.S. CD14 and TLR4 gene polymorphisms in adult periodontitis. **J Dent Res**, v.84, n. 11, p. 1042-6, 2005.
- LALOUEL, J.M.; RAO, D.C.; MORTON, N.E.; ELSTON, R.C. A unified model for complex segregation analysis. **Am J Hum Genet**, v. 35, p. 816-826, 1983.
- LALOUEL, J.M.; MORTON, N.E. Complex segregation analysis with pointers. **Hum Hered**, v. 31, p. 312-321, 1981.

LANDER, E.S.; LINTON, L.M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M.C.;  
BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE,  
R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, A.; HOWLAND, J.; KANN, L.;  
LEHOCZKY, J.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; MELDRIMM, J.;  
MESIROV, J.P.; MIRANDA, C.; MORRIS, W.; NAYLOR, J.; RAYMOND, C.;  
ROSETTI, M.; SANTOS, R.; SHERIDAN, A.; SOUGNEZ, C.; STANGE-  
THOMANN, N.; STOJANOVIC, N.; SUBRAMANIAN, A.; WYMAN, D.;  
ROGERS, J.; SULSTON, J.; AINSCOUGH, R.; BECK, S.; BENTLEY, D.;  
BURTON, J.; CLEE, C.; CARTER, N.; COULSON, A.; DEADMAN, R.;  
DELOUKAS, P.; DUNHAM, A.; DUNHAM, I.; DURBIN, R.; FRENCH, L.;  
GRAFHAM, D.; GREGORY, S.; HUBBARD, T.; HUMPHRAY, S.; HUNT, A.;  
JONES, M.; LLOYD, C.; MCMURRAY, A.; MATTHEWS, L.; MERCER, S.;  
MILNE, S.; MULLIKIN, J.C.; MUNGALL, A.; PLUMB, R.; ROSS, M.;  
SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; WATERSTON, R.H.; WILSON, R.K.; HILLIER,  
L.W.; MCPHERSON, J.D.; MARRA, M.A.; MARDIS, E.R.; FULTON, L.A.;  
CHINWALLA, A.T.; PEPIN, K.H.; GISH, W.R.; CHISSOE, S.L.; WENDL, M.C.;  
DELEHAUNTY, K.D.; MINER, T.L.; DELEHAUNTY, A.; KRAMER, J.B.;  
COOK, L.L.; FULTON, R.S.; JOHNSON, D.L.; MINX, P.J.; CLIFTON, S.W.;  
HAWKINS, T.; BRANSCOMB, E.; PREDKI, P.; RICHARDSON, P.; WENNING,  
S.; SLEZAK, T.; DOGGETT, N.; CHENG, J.F.; OLSEN, A.; LUCAS, S.; ELKIN,  
C.; UBERBACHER, E.; FRAZIER, M.; GIBBS, R.A.; MUZNY, D.M.; SCHERER,  
S.E.; BOUCK, J.B.; SODERGREN, E.J.; WORLEY, K.C.; RIVES, C.M.;  
GORRELL, J.H.; METZKER, M.L.; NAYLOR, S.L.; KUCHERLAPATI, R.S.;  
NELSON, D.L.; WEINSTOCK, G.M.; SAKAKI, Y.; FUJIYAMA, A.; HATTORI,  
M.; YADA, T.; TOYODA, A.; ITOH, T.; KAWAGOE, C.; WATANABE, H.;  
TOTOKI, Y.; TAYLOR, T.; WEISSENBAACH, J.; HEILIG, R.; SAURIN, W.;  
ARTIGUENAVE, F.; BROTTIER, P.; BRULS, T.; PELLETIER, E.; ROBERT, C.;  
WINCKER, P.; SMITH, D.R.; DOUCETTE-STAMM, L.; RUBENFIELD, M.;  
WEINSTOCK, K.; LEE, H.M.; DUBOIS, J.; ROSENTHAL, A.; PLATZER, M.;  
NYAKATURA, G.; TAUDIEN, S.; RUMP, A.; YANG, H.; YU, J.; WANG, J.;  
HUANG, G.; GU, J.; HOOD, L.; ROWEN, L.; MADAN, A.; QIN, S.; DAVIS,  
R.W.; FEDERSPIEL, N.A.; ABOLA, A.P.; PROCTOR, M.J.; MYERS, R.M.;  
SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; COX, D.R.; OLSON, M.V.;  
KAUL, R.; RAYMOND, C.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.;

- EVANS, G.A.; ATHANASIOU, M.; SCHULTZ, R.; ROE, B.A.; CHEN, F.; PAN, H.; RAMSER, J.; LEHRACH, H.; REINHARDT, R.; MCCOMBIE, W.R.; DE LA BASTIDE, M.; DEDHIA, N.; BLOCKER, H.; HORNISCHER, K.; NORDSIEK, G.; AGARWALA, R.; ARAVIND, L.; BAILEY, J.A.; BATEMAN, A.; BATZOGLOU, S.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BROWN, D.G.; BURGE, C.B.; CERUTTI, L.; CHEN, H.C.; CHURCH, D.; CLAMP, M.; COPLEY, R.R.; DOERKS, T.; EDDY, S.R.; EICHLER, E.E.; FUREY, T.S.; GALAGAN, J.; GILBERT, J.G.; HARMON, C.; HAYASHIZAKI, Y.; HAUSSLER, D.; HERMIAKOB, H.; HOKAMP, K.; JANG, W.; JOHNSON, L.S.; JONES, T.A.; KASIF, S.; KASPRYZK, A.; KENNEDY, S.; KENT, W.J.; KITTS, P.; KOONIN, E.V.; KORF, I.; KULP, D.; LANCET, D.; LOWE, T.M.; MCLYSAGHT, A.; MIKKELSEN, T.; MORAN, J.V.; MULDER, N.; POLLARA, V.J.; PONTING, C.P.; SCHULER, G.; SCHULTZ, J.; SLATER, G.; COLLINS, F.; SMIT, A.F.; STUPKA, E.; SZUSTAKOWSKI, J.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; WAGNER, L.; WALLIS, J.; WHEELER, R.; WILLIAMS, A.; WOLF, Y.I.; WOLFE, K.H.; YANG, S.P.; YEH, R.F.; GUYER, M.S.; PETERSON, J.; FELSENFELD, A.; WETTERSTRAND, K.A.; PATRINOS, A.; MORGAN, M.J.; DE JONG, P.; CATANESE, J.J.; OSOEGAWA, K.; SHIZUYA, H.; CHOI, S.; CHEN, Y.J. International Human genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the Human Genome. **Nature - The Human Genome**, v. 409, p. 860-921, February, 2001.
- LATHROP, G.M.; LALOUEL, M. Easy calculations of LOD Scores and genetic risks on small computers, **Am J Hum Gen**, v. 36, p. 460-465, 1984.
- LEAL, J.B. Prognathies fonctionelles de la mandibule. **Rev Port Stomatol Cir Maxillofac**, v. 11, n. 1, p. 97-101, 1970.
- LIDRAL, A.C.; REISING, B.C. The role of MSX1 in human tooth agenesis. **J Dent Res**, v. 81, n. 4, p. 274-278, 2002.
- LITTON, S.F.; ACKERMAN, L.V.; ISSACSON, R.J.; SHAPIRO B.L. A genetic study of Class III malocclusion. **Am J Orthod**, v. 58, n. 6, p.565-77. 1970.
- MAH, J. Genetics of the “Habsburg jaw”. **Europ Orthod Soc Res**, v. 1, p. 1-8, 2001.

- MARTINS, D.R.; CANUTO, C.E.; SIGUEIRA, V.C.V.; SANTOS, E.C.A. Epidemiologia das maloclusões. **Rev Odont Master: Ortodont**, v.1, n.1, p.1 - 31, 1994.
- MASSLER, M.; FRANKEL, J.M. Prevalence of malocclusion in children aged 14 to 18 years. **Am J Orthod**, v. 37, p. 751-768, 1951.
- MAUCHAMP, O.P. Transmissions poligéniques. **Actual odontostomatol**, v. 33, n. 127, p. 503-518, 1979.
- MCKUSICK, V.A. **Heritable disorders of connective tissue**. 4<sup>th</sup> ed., C.V. Mosby, St. Louis, 1972.
- MCNAMARA, J.A. Jr.; CARLSON, D.S. Quantitative analysis of temporomandibular joint adaptations to protrusive function. **Am J Orthod**, v. 76, n. 6, p. 593-611, 1979.
- MHLW (MINISTRY OF HEALTH, LABOR AND WELFARE, JAPAN). Report on the survey of dental diseases. **Dental Health Division of Health Policy Bureau**, Japan, 1999.
- MILICESCO, V. La valeur de la photographie, de la crâniométrie et de la téléradiographie dans le prognathisme mandibulaire anatomique. **Rev stomatol**, v. 69, n. 6, p. 474-480, 1968.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16, p. 1215, 1988.
- MIOTTI, A. Rassegna bibliografica sull' eziologia ed epidemiologia del prognatismo mandibolare. **Dent cadmos**, v. 50, n. 5, p. 29-32, 1982.
- MONTELEONE, L.; DUVIGNEAUD, J.D. Prognathism. **J oral surg**, v. 21, p. 190-195, 1963.
- MORTON, N.E. Sequential tests for the detection of linkage. **Am J Hum Genet**, v. 7, p. 277-318, 1955.
- MORTON, N.E.; RAO, D.C.; LALOUEL, J.M. **Methods in genetic epidemiology**. Basel: Karger, 1983.
- MOSS, M.L. New studies of cranial growth. **Birth defects orig artic ser**, v. 11, n.7, p. 283-295, 1975.

- MOSS, M.L. The functional matrix hypothesis revisited – The genomic thesis. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v. 113, n. 3, p. 338-342, 1997.
- MOSSEY, P.A. The heritability of malocclusion: part 1 – genetics, principles and terminology. **Br J Orthod**, v. 26, n. 2, p. 103-113, June 1999<sup>a</sup>.
- MOSSEY, P.A. The heritability of malocclusion: part 2 –The influence of genetics in malocclusion. **Br J Orthod**, v. 26, n. 3, p. 195-203, September 1999<sup>b</sup>.
- MUNDLOS, S. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. **Cell**, v. 89, p. 773-779, 1997.
- NARIYAMA, M.; SHIMIZU, K.; UEMATSU, T.; MAEDA, T. Identification of chromosomes associated with dental caries susceptibility using quantitative trait locus analysis in mice. **Caries Res**, v. 38, n. 2, p. 79-84, 2004.
- NEWMAN, G.V. Prevalence of malocclusion in children six to fourteen years of age and treatment in preventable cases. **J Am Dent Assoc**, v. 52, p. 566-575, 1965.
- NICHOLS, A.C.; OLIVER, J.; McCarron, S.; WINTER, G.B.; POPE, F.M. Splice site mutation causing deletion of exon 21 sequences from the proa2(I) chain of type I collagen in a patient with severe dentinogenesis imperfecta but very mild osteogenesis imperfecta. **Hum Mutat**, v. 7, p. 219-227, 1996.
- O'BRIEN, S.J.; NELSON, G.W.; WINKLER, C.A.; SMITH, M.W. Polygenic and multifactorial disease gene association in man: lessons from AIDS. **Annu Rev Genet**, v. 34, p. 563-591, 2000.
- OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – sítio acessado em Agosto de 2006.
- PASCOE, J.; HAYWARD, J.R.; COSTICH, E.R. Mandibular prognathism, its etiology and classification. **J Oral surgery**, v. 18, p.21-24, 1960.
- PENA, S.D.J.; PENNA, M.L.F. O prognatismo mandibular dos Habsburgos na família imperial brasileira. **Rev Br Genet**, v.11, n.4, p. 1017-1021, 1988.
- PLOUGHMAN, L.; BOEHNKE, M. Estimating the power of a proposed linkage study for a complex genetic trait. **Am J Hum Gen**, v. 44, p. 543-551, 1999.
- PROFITT, W.R.; PHILLIPS, C.; DANN, C. Who seeks surgical-orthodontical treatment? **Int J Adult Orthod Orthognath Surg**. v. 5, n. 3, p. 153-60, 1990.



- RAO, D.C.; PROVINCE, M.A. **Genetic dissection of complex traits**. Academic Press, San Diego, 583 p., 2001.
- RICE, T.K.; BORECKI, I.B. **Familial Resemblance and heritability**. In: Rao, D.C. and Province M.A., editors. Genetic dissection of complex traits. San Diego: Academic Press, p. 35-44, 2001.
- RISCH, N. Linkage strategies for genetically complex traits: the power of affected relative pairs. **Am J Hum Gen**, v. 46, p. 229-41, 1990.
- ROBERTS, R.; STEWART, A.F. Personalized genomic medicine: a future prerequisite for the prevention of coronary artery disease. **Am Heart Hosp J**, v. 4, n. 3, p. 222-7, 2006.
- RUBBRECHT, O. Study of the heredity of the anomalies of the jaws. **Am J Orthodont**, v. 25, p. 751-779, 1939.
- RUMP, P.; LETTEBOER, T.G.; GILLE, J.J.; TORRINGA, M.J.; BAERTS, W.; Van GESTEL, J.P.; VERHEIJ, J.B.; VAN ESSEN, A.J. Severe complications in a child with achondroplasia and two FGFR3 mutations on the same allele. **Am J Med Genet**, v. 140, n.3, p. 284-90, Feb. 2006.
- SALEH, F.K. Prevalence of malocclusion in a sample of Lebanese schoolchildren: an epidemiological study. **East Mediterr Health J**, v. 5, n. 2, p. 337-43, 1999.
- SATGE, D.; GENEIX, A.; GOBURDHUN, J.; LASNE-DESMET, P.; ROSENTHAL, C.; ARNAUD, R.; MALLET, P. A history of miscarriages and mild prognathism as possible mode of presentation of mosaic trisomy 18 in women. **Clin Genet**, v. 50, n. 6, p. 470-473, 1996.
- SATOKATA, I.; MAAS, R.; MSX1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. **Nature Genetics**, v. 6, p. 348-356, 1994.
- SCHOENWETTER, R.F. A possible relationship between certain malocclusions and difficult or instruments deliveries. **Angle Orthod**, v. 44, p. 336-340, 1974.
- SCHULZE, C.; WEISE, W. Zur Verebung der progenie. **Fortschr fte kieferorthop**, v. 26, p. 213-229, 1965.

- SHAM, P.C. Sequential analysis and case-control candidate gene association studies: reply to Sobell et al. **Am J Med Gen**, v. 54, p. 154-157, 1994.
- SHARMA, P.; FATIBENE, J.; FERRARO, F.; JIA, H.; MONTEITH, S.; BROWN, C.; CLAYTON, D.; O'SHAUGHNESSY, C.U.; BROWN, M.J. A genome-wide search for susceptibility loci to human essential hypertension. **Hypertension**, v. 35, p. 1291-1296, June 2000.
- SIMPSON, J.L. Screening for fetal and genetic abnormalities. **Baillieres Clin Obstet Gynaecol**, v. 5, n. 3, p. 675-96, 1991.
- SINGH, G.D. Morphologic determinants in the etiology of class III malocclusion: a review. **Clin Anat**, v. 12, n. 5, p. 382-405, 1999.
- SINGH, G.D.; MCNAMARA, J.A. Jr.; LOZANOFF, S. Procrustes, Euclidean and cephalometric analyses of the morphology of the mandible in human class III malocclusions. **Arch Oral Biol**, v. 43, p. 535-543, 1998<sup>a</sup>.
- SINGH, G.D.; MCNAMARA, J.A. Jr.; LOZANOFF, S. Mandibular morphology in subjects with class III malocclusions: finite-element morphology. **Angle Orthod**, v. 68, n. 5, p. 409-418, 1998<sup>b</sup>.
- SINGH, G.D.; MCNAMARA, J.A. Jr.; LOZANOFF, S. Morphometry of the cranial base in subjects with class III malocclusion. **J Dent Res**, v. 76, n. 2, p. 694-703, 1997.
- SOBELL, J.L.; HESTON, L.L.; SOMMER, S.S. Novel association approach for determining the genetic predisposition to schizophrenia: case-control resource and testing of a candidate gene. **Am J Med Gen**, v. 48, p. 28-35, 1993.
- STEIN, G. S.; LIAN, J. B.; VAN WIJNEN, A. J.; STEIN, J. L.; MONTECINO, M.; JAVED, A.; ZAIDI, S. K.; YOUNG, D. W.; CHOI, J.Y.; POCKWINSE, S. M. : Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. **Oncogene**, v. 23, p. 4315-4329, 2004.
- STEVENS, C.A.; ROEDER, E.R. Ser351Cys mutation in the fibroblast growth factor receptor 2 gene results in severe Pfeiffer syndrome. **Clin Dysmorphol**, v. 15, n. 3, p. 187-188, Jul, 2006.
- STILES, K.A.; LUKE, J.E. The inheritance of malocclusion due to mandibular prognathism. **J Hered**, v. 44, p. 241-5, 1953.

- STROHMAYER, W. Die vereburg des Hapsburger familientypus. **Nova Acta Leopold**, v. 5, p. 219-296, 1937.
- SUZUKI, S. Studies on the so-called reverse occlusion. **J. Nihon Univ Sch Dent**, v. 5, p. 51-58, 1961.
- TEARE, M.D.; BARRET, J.H. Series: genetic epidemiology 2. Genetic linkage studies. **Lancet**, v. 366, p. 1036-44. 2005.
- THOMAS, D.C. **Statistical methods in genetic epidemiology**. Oxford University press, New York, 435p., 2004.
- THOMPSON, E.M.; WINTER, R.M. Another family with the “ Habsburg jaw”. **J Med Genet**, v. 25, n. 12, p. 838-42, December 1988.
- TOLLARO, I.; BACCETTI, T.; FRANCHI, L. Class III malocclusion in the deciduous dentition: a morphological and correlation study. **Europ J Orthod**, v. 16, p. 401-408, 1994.
- VASTARDIS, H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 117, n.6, p. 650-656, June 2000.
- VASTARDIS, H.; KARIMBUX, N.; GUTHUA, S.W. A Human MSX1 homeodomain mutation causes selective tooth agenesis. **Nature Genetics**, v. 13, p. 417-421, 1996.
- VENTER, C.J., ADAMS, M.D.; MYERS, E.W.; LI, P.W.; MURAL, R.J.; SUTTON, G.G.; SMITH, H.O.; YANDELL, M.; EVANS, C.A.; HOLT, R.A.; GOCAYNE, J.D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R.M.; HUSON, D.H.; WORTMAN, J.R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C.D.; ZHENG, X.H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P.D.; ZHANG, J.; MIKLOS, J.L.G.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A.G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V.A.; ZINDER, N.; LEVINE, A.J.; ROBERTS, R.J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.;

GABRIELIAN, A.E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T.J.; HIGGINS, M.E.; JI, R.; KE, Z.; KETCHUM, K.A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G.V.; MILSHINA, N.; MOORE, H.M.; NAIK, A.K.; NARAYAN, V.A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D.B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.Y.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.; YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHONG, F.; ZHONG, W.; ZHU, S.C.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M.L.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKOCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N.N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, J.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J.F.; GUIGÓ, R.; CAMPBELL, M. J.; SJOLANDER, K.V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A.D.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.;

- NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, T.; NODELL, M.; PAN, P.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; AND ZHU, X.. The sequence of Human genome. **Science**, v. 291, n. 5507, p: 1145-1434, 2001.
- VRIES, L. de; KAUSCHANSKY, A.; SHOHAT. M.; PHILLIP, M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 4, p. 1794-1800, April 2004.
- WALKER, M.B.; TRAINOR, P.A. Craniofacial malformations: intrinsic vs extrinsic neural crest cell defects in Treacher Collins and 22q11 deletion syndromes. **Clin Genet**, v. 69, n. 6, p. 471-9, 2006.
- WATANABE, M; SUDA, N.; OHYAMA, K. Mandibular prognathism in Japanese families ascertained through orthognatically treated patients. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 128, n.4, p. 466-470, October 2005.
- WEBER, J.L.; BROMAN, K.W. **Genotyping for human whole-genome scans: past, present and future**. In: Rao, D.C. and Province M.A., editors. Genetic dissection of complex traits. San Diego: Academic Press, p. 77- 96, 2001.
- WEBER, J.L.; MAY, P.M. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am J Hum Genet**, v. 44, p. 388-396, 1989.
- WILSON J.F.; WEALE, M.E.; SMITH A.C. Population genetic structure of variable drug response. **Nature Genetics**, v. 29, p. 265-269, 2001.
- WOLFF, G.; WIENKER, T.F.; SANDER, H. On the genetics of mandibular prognathism: analysis of large European noble families. **J Med Genet**, v. 30, n. 2, p. 112-116, February 1993.
- WOOD, A.J.J. Racial differences in the response to drugs – pointers to genetic differences. **New Engl J Medic**, v. 344, p. 1393-1395, 2001.
- YAMAGUCHI, T.; PARK, S.B.; NARITA, K.; MAKI, K.; INOUE, I. Genome-wide linkage analysis of mandibular prognathism in Korean and Japanese patients. **J Dent Res**, v. 84, n. 3, p. 255-259, 2005.

- YANG, W.S. The study on the orthodontic patients who visited Department of Orthodontics, Seoul National University Hospital. **Tehan Chikkwa Uisa Hyophoe Chi**, v. 28, p; 811-821, 1990.
- YOSHIDA, C. A.; YAMAMOTO, H.; FUJITA, T.; FURUICHI, T.; ITO, K.; INOUE, K.; YAMANA, K.; ZANMA, A.; TAKADA, K.; ITO, Y.; KOMORI, T. : Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. **Genes Dev**, v. 18, p. 952-963, 2004.
- YU, N.; CHEN, F.C.; OTA, S. Larger genetic differences within Africans than between Africans and Eurasians. **Genetics**, v. 161, p. 269-274, 2002.
- ZAMMIT, M.P.; HANS, M.G.; BROADBENT, B.H.; JOHNSEN, D.C.; LATIMER, B.M.; NELSON, S. Malocclusion in Labrador Inuit youth: a psychosocial, dental and cephalometric evaluation. **Arctic Med Res**, v. 54, n. 1, p. 32-44, 1995.

## *ANEXOS*

**ANEXO 1****UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O abaixo assinado, \_\_\_\_\_ declara ter sido plenamente esclarecido, lido e ouvido o presente termo de responsabilidade que lhe informa estar ciente do seguinte:

a) Que pelo presente documento concordo em participar da pesquisa “Mapeamento genético do prognatismo mandibular” executado pelo Departamento de Genética da Universidade de Brasília, coordenada pela Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira (UnB – IB – GEM – telefone 61 3307-2161), visando tentar identificar e localizar o gene ou os genes responsáveis pelo prognatismo mandibular (crescimento exagerado do queixo e da mandíbula) e;

b) Que fui convidado a participar deste estudo porque eu ou meus parentes posso ter o gene de interesse, responsável pela característica física que será estudada;

c) Que minha participação implicará na retirada de uma amostra de aproximadamente 5ml de sangue de uma das veias do antebraço ou, alternativamente, coleta de esfregaço da mucosa bucal por *swab*. No caso da coleta de sangue, será utilizado o sistema de coleta à vácuo, com agulha estéril (não contaminada por microorganismos) e descartável. No caso do *swab*, um material de coleta similar a um grande cotonete, será esfregado gentilmente no lado interno da bochecha, também será utilizado material estéril (não contaminada por microorganismos) e individual. Esses procedimentos são usuais nas pesquisas genéticas, não implicando risco para a saúde, podendo, porém, provocar um pouco de dor no local de penetração da agulha, no caso da coleta de sangue;

d) Que minha participação também será na forma de fornecimento de dados pessoais e familiares que serão usados para ajudar na definição dos membros da família que possuem o problema (prognatismo mandibular), a fim de caracterizar melhor a amostra (ou seja, tornar o grupo pesquisado mais homogêneo) e, portanto, não serão divulgados de forma a individualizar os participantes que os forneceram;

e) Que esta participação implicará também na tomada de uma teleradiografia cefalométrica lateral (em um segundo momento a ser combinado com o pesquisador). Essa radiografia mostra todas as estruturas da cabeça numa vista lateral. Caso já tenha esse material, solicitado em um tratamento ortodôntico ao qual tenha sido submetido anteriormente, e ele esteja em boa qualidade, não haverá necessidade de novos exames.

f) Que eu você estiver grávida e precisar coletar sangue ou fazer tomadas radiográficas, esses exames serão adiados até o nascimento do bebê. A coleta de células da mucosa bucal através do *swab* não oferece nenhum risco à gestação;

g) Que o material coletado (sangue ou esfregaço da mucosa bucal) será utilizado para estudar as diferenças genéticas que ocorrem entre indivíduos e grupos de indivíduos e



para a tentativa de localização de genes responsáveis pelo prognatismo mandibular humano (“queixo grande”). A análise destas diferenças genéticas entre indivíduos será feita usando métodos químicos e de separação de elementos (moléculas) em um campo elétrico (eletroforese);

h) Que o material genético coletado poderá ser analisado em Centros de Pesquisa no exterior, mas sempre voltando ao Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, local onde ficará estocado até o fim de todas as análises pertinentes;

i) Que minha recusa em participar do projeto poderá ser feita a qualquer tempo, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, e que ficarei livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, bastando para tanto a comunicação ao responsável pelo projeto, identificado neste termo, sendo que esse procedimento não implica em nenhuma despesa para mim ou qualquer outra pessoa;

i) Que os dados genéticos gerados serão utilizados exclusivamente em pesquisas científicas, que poderão ser divulgadas sob a forma de relatórios e artigos científicos, ou ainda artigos de divulgação voltados para o público leigo. A divulgação dos dados, contudo, será feita sempre de modo global, não havendo, portanto, a divulgação de dados individuais;

j) Que minha participação no projeto é totalmente voluntária, não acarretando despesa a qualquer uma das partes, em qualquer tempo;

K) Que não terei nenhum benefício pessoal em participar desta pesquisa, a não ser a oportunidade de ajudar a ciência a entender melhor o papel da genética no desenvolvimento do prognatismo mandibular;

l) Que, mediante meu interesse, poderei ter acesso (ver ou examinar), em qualquer tempo, aos resultados globais e obtidos a partir da análise de minha amostra, porém não aos dados relativos a outros indivíduos da pesquisa, garantindo a privacidade dos mesmos.

m) Que, em caso de dúvidas ou esclarecimentos adicionais poderei contatar diretamente a Coordenadora do Projeto, Profa. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira (UnB – IB – GEM – telefone 61 3307-2161) ou o pesquisador responsável, Dr. Ricardo Machado Cruz (telefone 61 3245-7500).

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente (ou responsável)

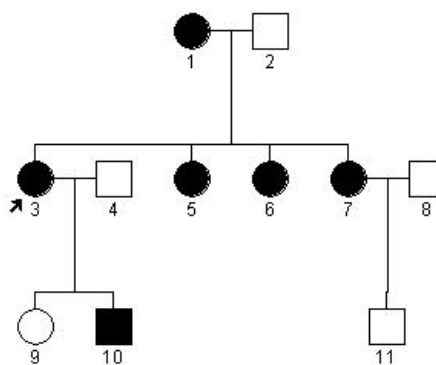
Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Documento de identidade: \_\_\_\_\_

Responsável pela pesquisa: \_\_\_\_\_

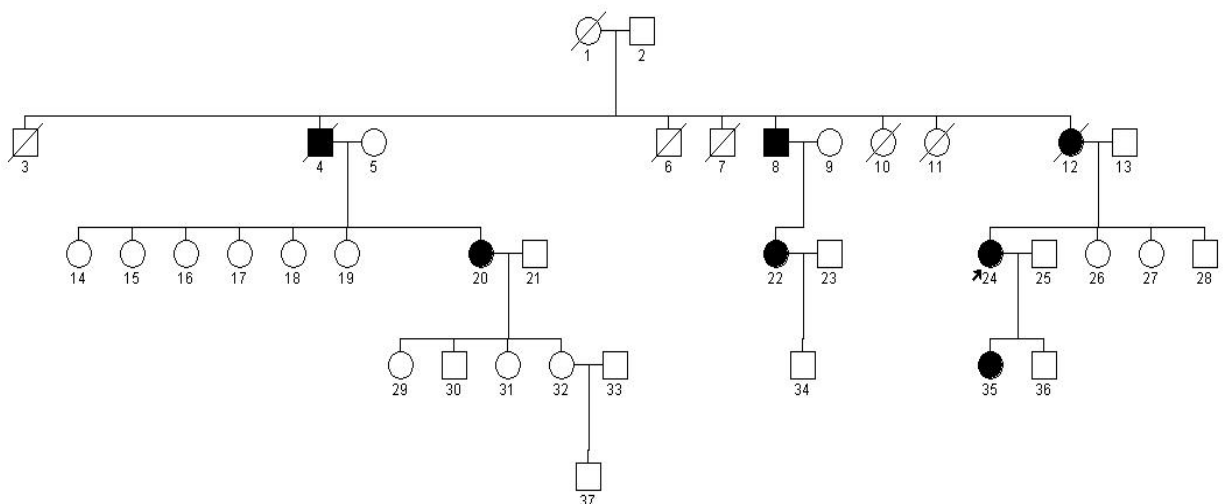
**ANEXO 2**

***Heredogramas das 55 famílias brasileiras averiguadas por meio de probandos com prognatismo mandibular com os padrões de herança sugeridos após análise visual.***

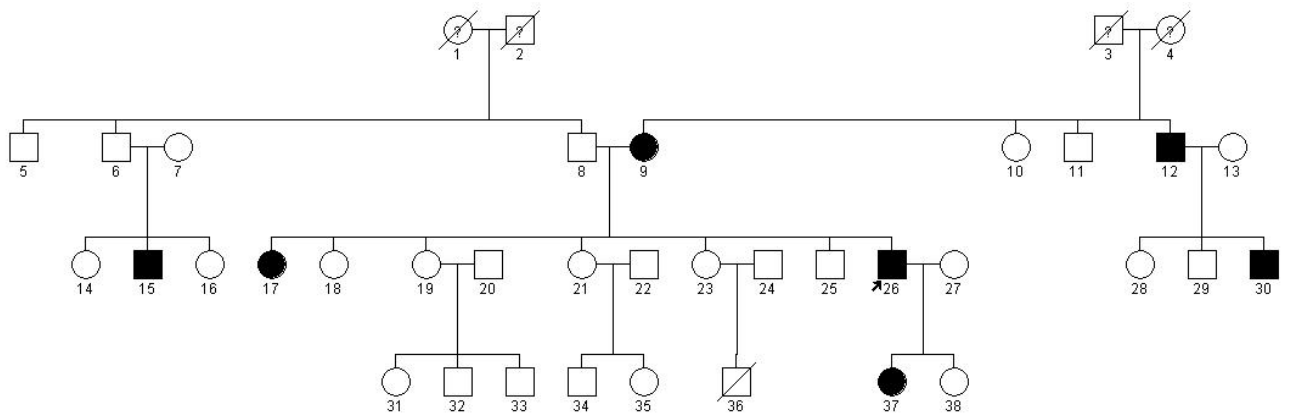
Família 01 – Padrão de herança autossômico dominante.



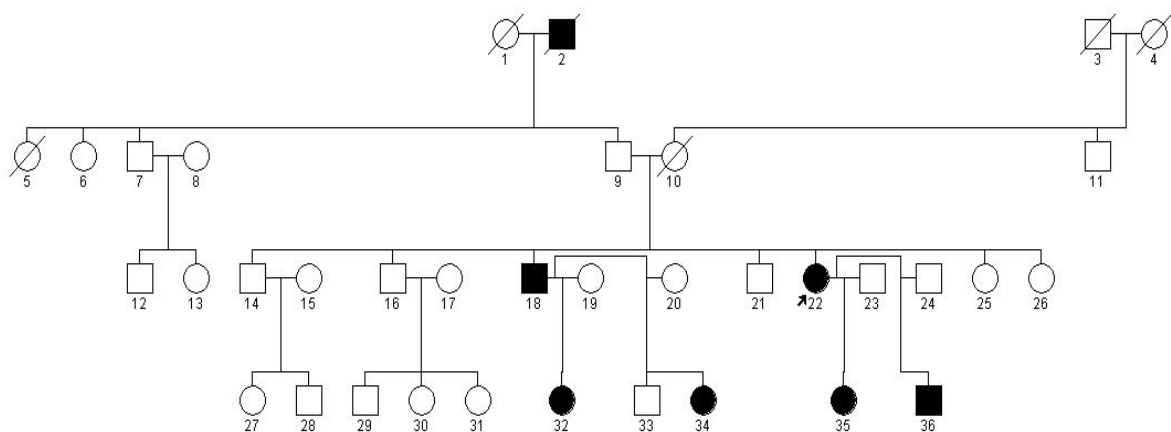
Família 02 – Padrão de herança autossômico dominante



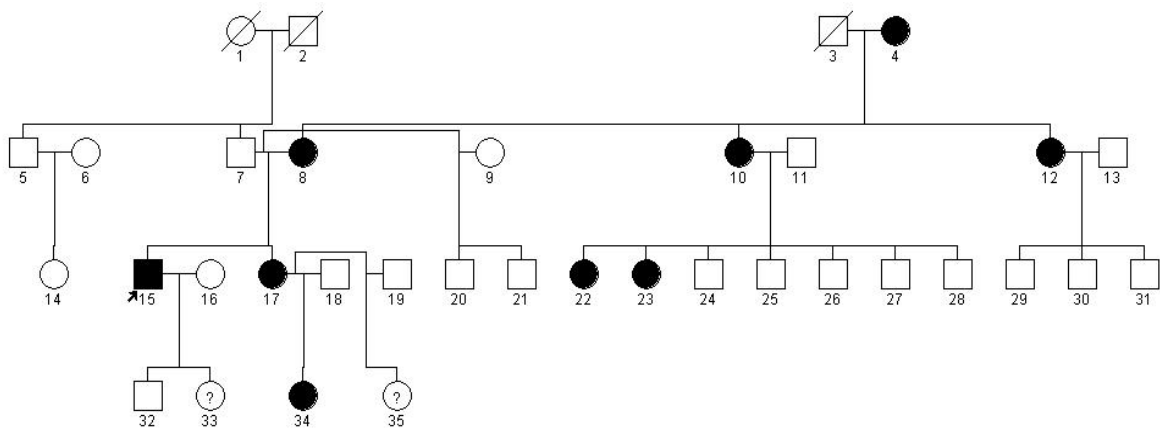
Família 03 – O lado direito do heredograma mostra uma herança autossômica dominante. O indivíduo 15 não pertence a esta família e seu *status* de afetado provavelmente seja devido a um gene diferente com características recessivas, a uma nova mutação ou mesmo seja uma fenocópia.



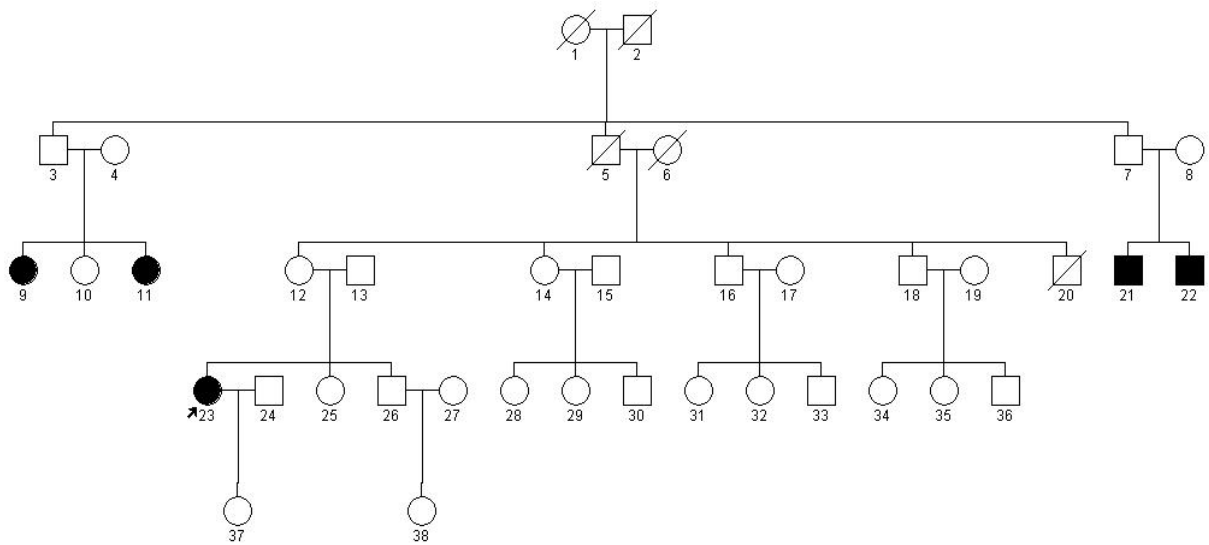
Família 04 – Esse heredograma mostra um padrão dominante com penetrância incompleta porque o fenótipo “saltou” a segunda geração.



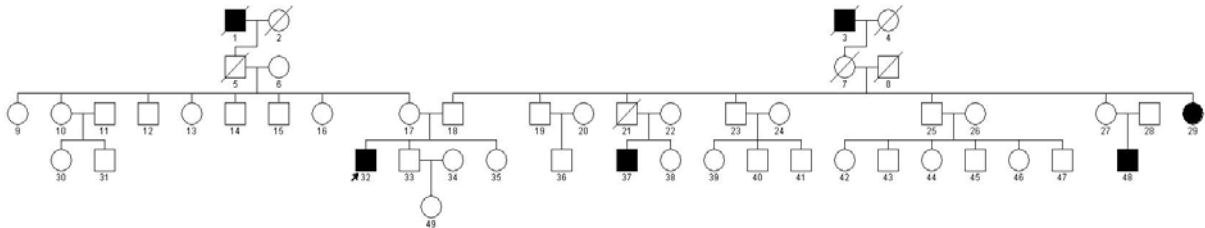
Família 05 - Padrão de herança autossômico dominante.



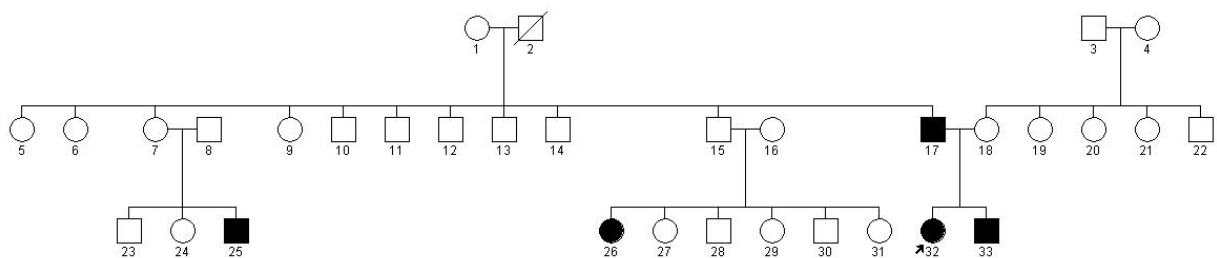
Família 06 – Heredograma mostrando um padrão autossômico dominante com penetrância incompleta, pois todos os indivíduos afetados têm um ancestral comum.



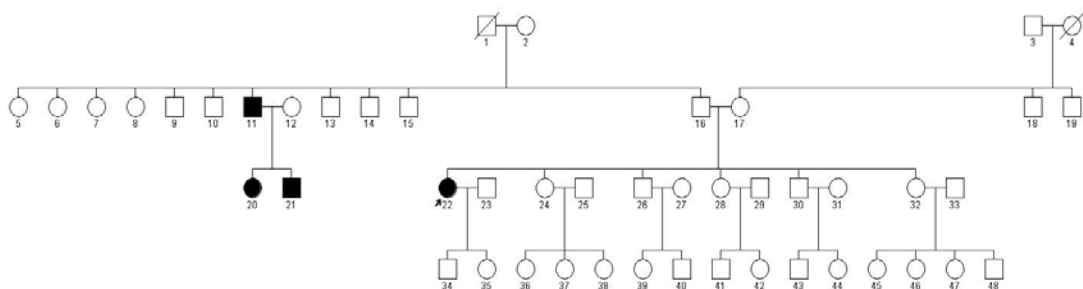
Família 07 – O lado direito desse heredograma mostra um padrão dominante com penetrância incompleta. O indivíduo 1 não pertence a essa família, e como já havia falecido a informação a respeito de seu status de afetado não pôde ser comprovada. Se realmente era afetado, então seu problema poderia ser autossômico recessivo ou até mesmo uma nova mutação.



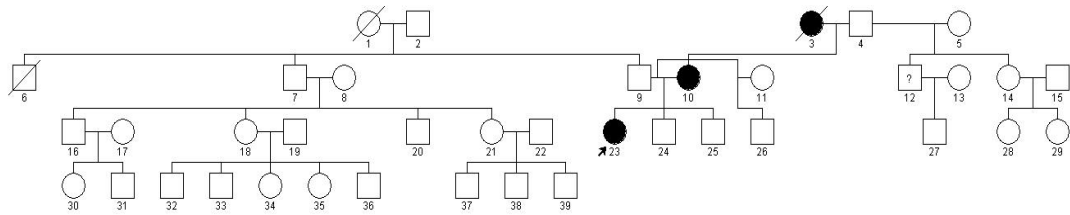
Família 08 – Padrão de herança dominante com penetrância incompleta.



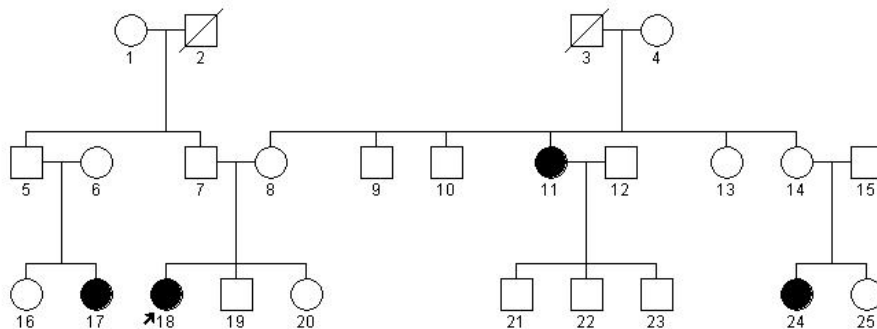
Família 09 – Padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta.



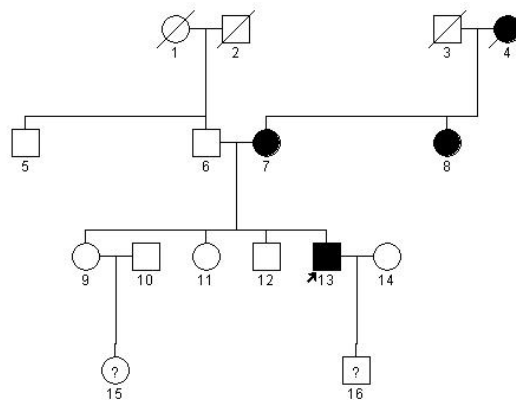
Família 10 – Padrão de herança autossômico dominante.



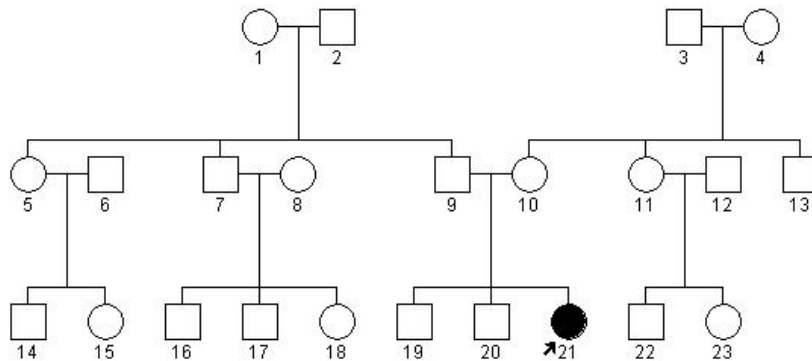
Família 11 – Em geral esse heredograma mostra um padrão de herança com penetrância incompleta. Se a probanda recebeu seu alelo de seu pai, ela provavelmente tem o mesmo alelo de sua prima (indivíduo 17), o que daria a este heredograma a classificação de dominante com penetrância incompleta. Mas se ela recebeu o alelo de sua mãe, terá os mesmos alelos do resto da família do lado direito do heredograma (dominante com penetrância incompleta) e o indivíduo 17 teria outro gene ou nova mutação. Nesse caso teríamos uma heterogeneidade de *locus*.



Família 12 - Padrão de herança autossômico dominante.



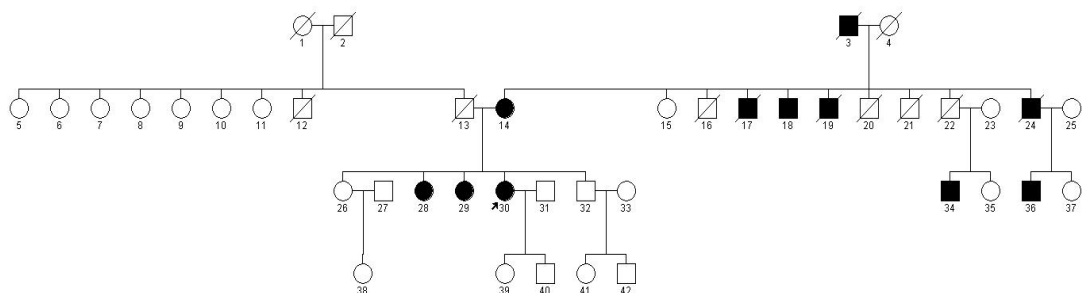
Família 13 – Somente a probanda é afetada. Pode significar padrão de herança autossômico recessivo ou nova mutação.



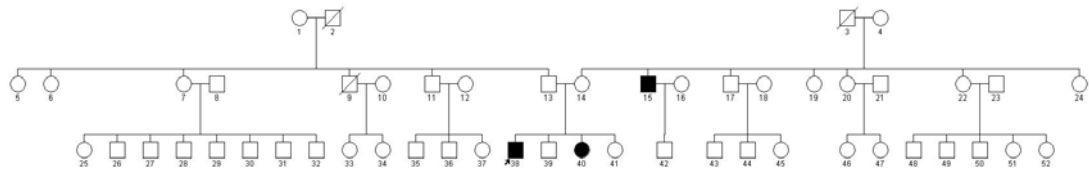
Família 14 – Padrão de herança dominante com penetrância incompleta, uma vez que o prognatismo mandibular saltou a primeira geração e o indivíduo 10 não é afetado.



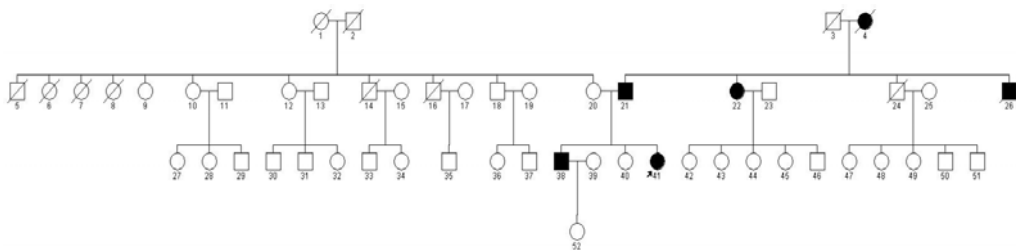
Família 15 – Padrão de herança autossômico dominante.



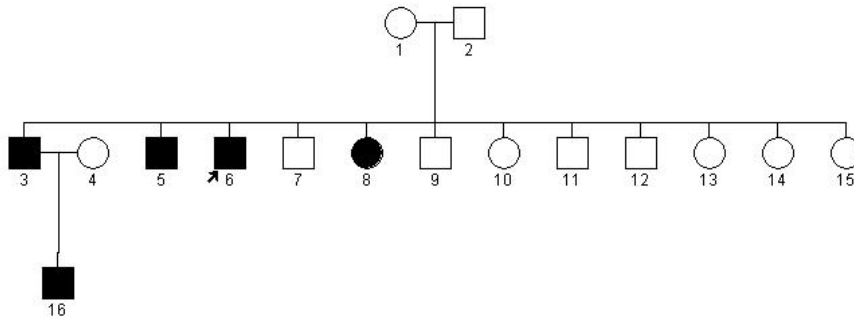
Família 16 – Padrão de herança dominante com penetrância incompleta.



Família 17 – Padrão de herança autossômico dominante.

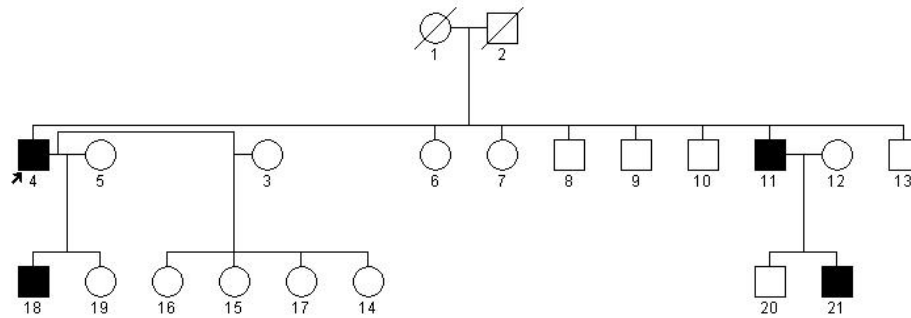


Família 18 – Padrão de herança dominante com penetrância incompleta, pois os indivíduos 1 e 2 não são afetados.

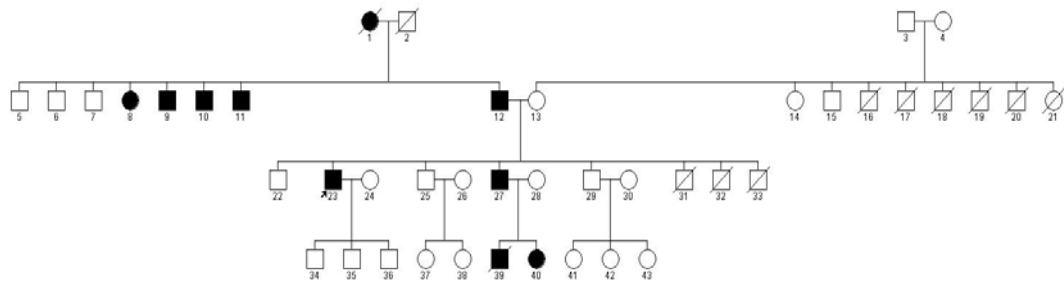




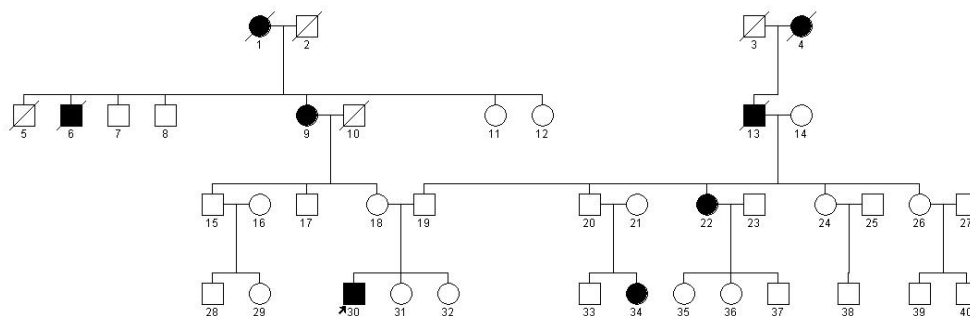
Família 19 – Padrão de herança dominante com penetrância incompleta se os indivíduos 1 e 2 realmente fossem não afetados (essa informação pode estar errada e não pôde ser provada uma vez que ambos já haviam falecido na época da investigação).



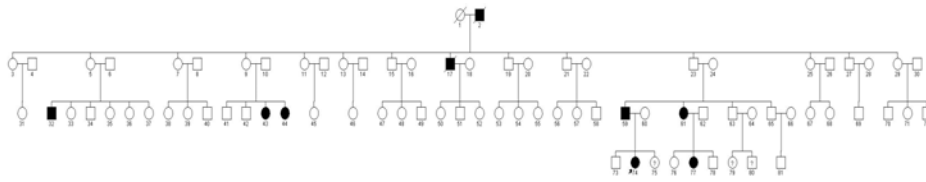
Família 20 – Padrão de herança autossômico dominante.



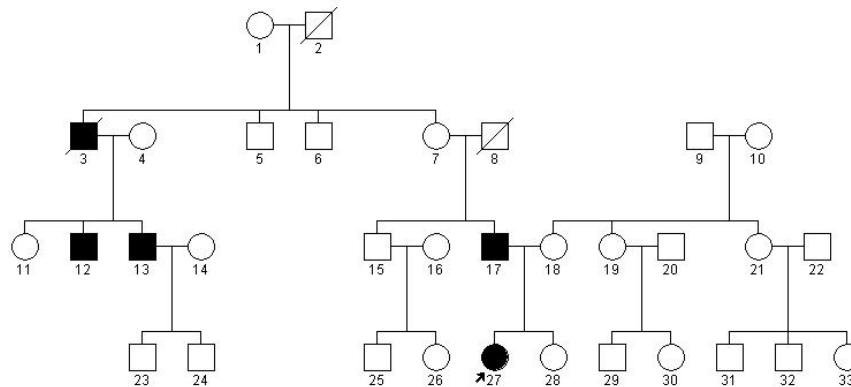
Família 21 – Duas famílias mostrando a segregação do prognatismo mandibular, possivelmente causados por genes diferentes. Como os indivíduos 18, 19, 20 e 21 não são afetados, o padrão de herança é considerado dominante com penetrância incompleta.



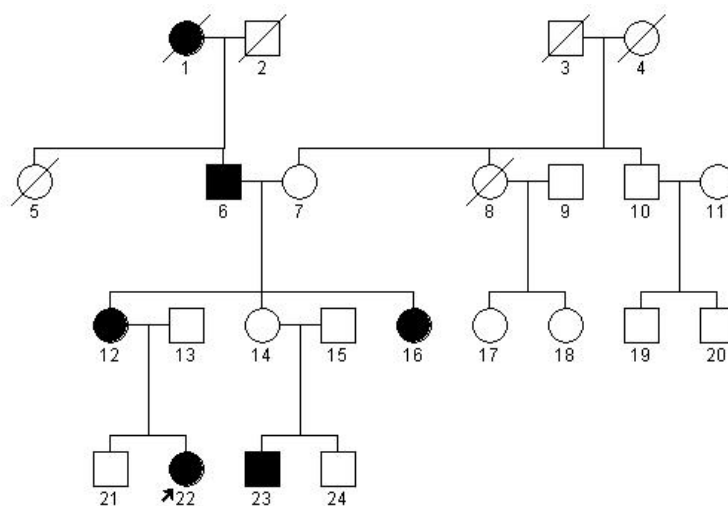
Família 22 - Apresenta um modelo dominante com penetrância incompleta.



Família 23 – Padrão de herança dominante com penetrância incompleta pois os indivíduos 1 ou 2 e o indivíduo 7 não são afetados.



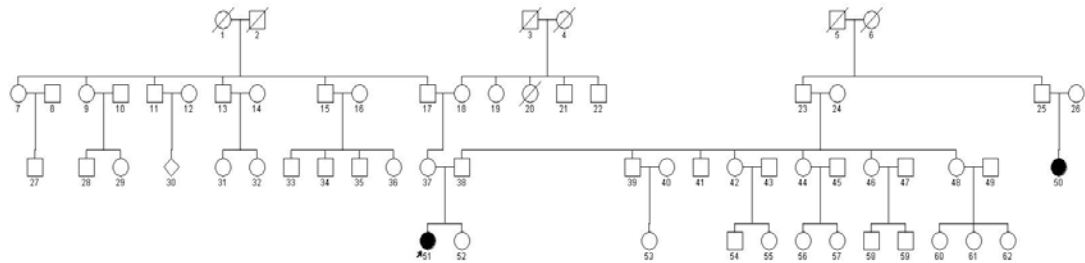
Família 24 – Apresenta um padrão dominante com penetrância incompleta, pois o indivíduo 14 não é afetado.



Família 25 – Padrão de herança autossômico dominante.



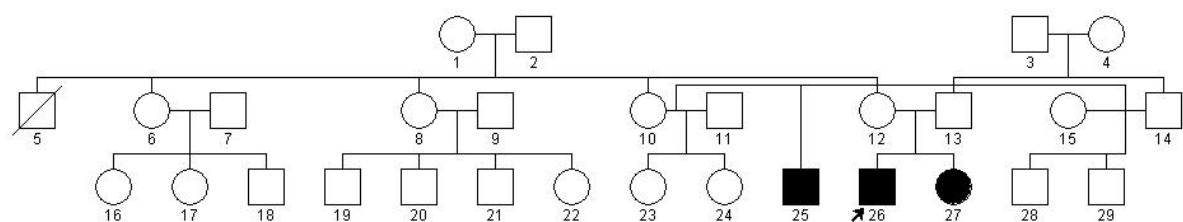
Família 26 – Como há somente dois indivíduos afetados: a probanda e sua prima de 2º grau, pode-se dizer que houve uma nova mutação (apesar de ser extremamente raro haver duas mutações novas na mesma família) ou se tratar de um modelo autossômico recessivo (se os indivíduos 26 e 37 não informaram um possível parentesco).



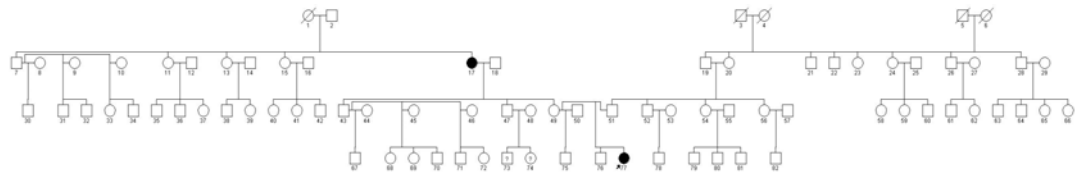
Família 27 – Duas famílias apresentando um modelo dominante com penetrância incompleta.



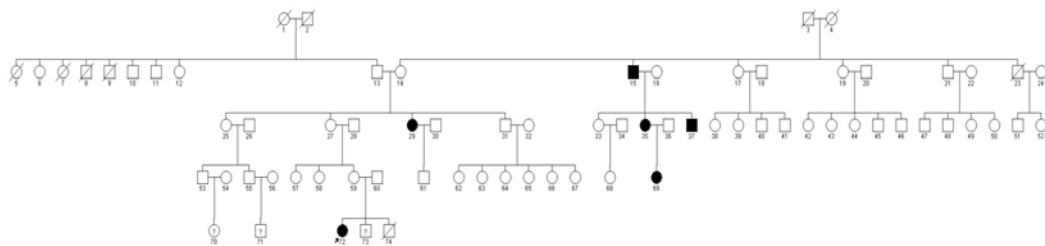
Família 28 – Padrão de herança dominante com penetrância incompleta.



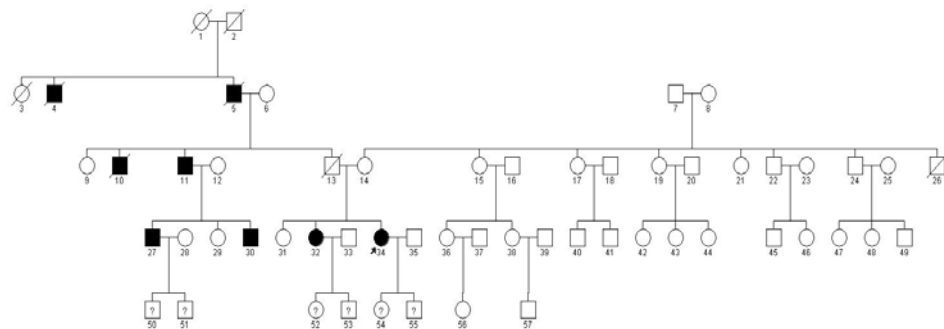
Família 29 – Padrão de herança dominante com penetrância incompleta.



Família 30 – Padrão de herança dominante com penetrância incompleta.



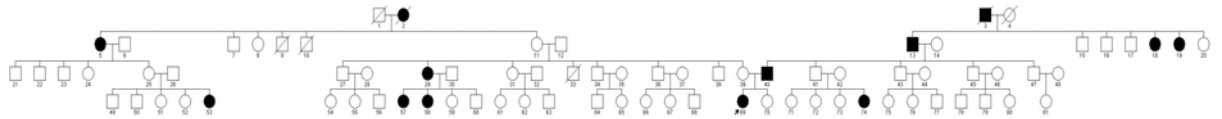
Família 31 – Apresenta um modelo autossômico dominante se considerar que a informação a respeito do *status* dos indivíduos 1, 2 e 13 não está correta (não pôde ser comprovado, pois haviam falecido na época da investigação).



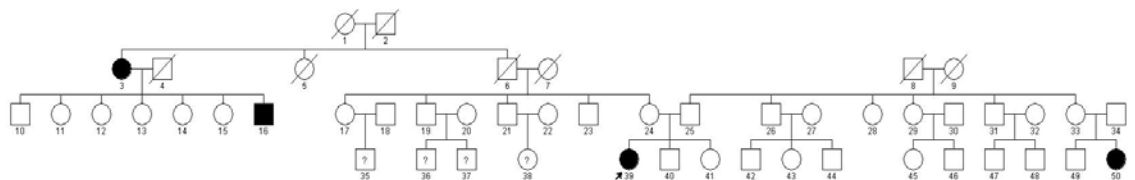
Família 32 – O prognatismo mandibular está segregando em duas famílias diferentes, provavelmente devido a dois diferentes genes ou grupos de genes. Ambas as famílias mostram um padrão dominante com penetrância incompleta.



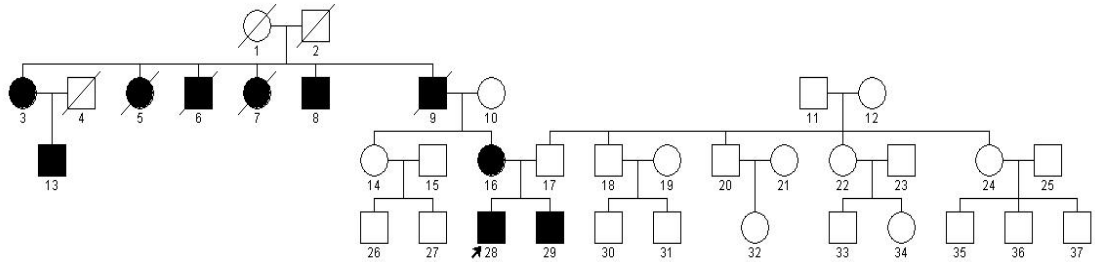
Família 33 – O prognatismo mandibular está segregando em duas famílias diferentes, provavelmente devido a dois diferentes genes ou grupos de genes. Ambas as famílias mostram um padrão dominante com penetrância incompleta.



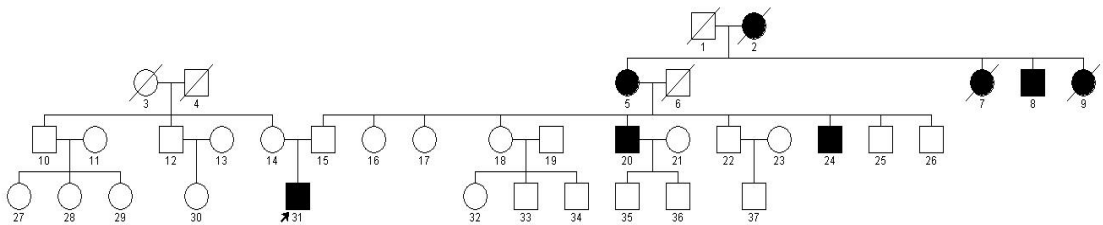
Família 34 – Esse heredograma mostra duas famílias. A família do lado esquerdo mostra um padrão dominante com penetrância incompleta, e a família do lado direito mostra um padrão autossômico recessivo ou uma nova mutação, porque somente o indivíduo 50 é afetado.



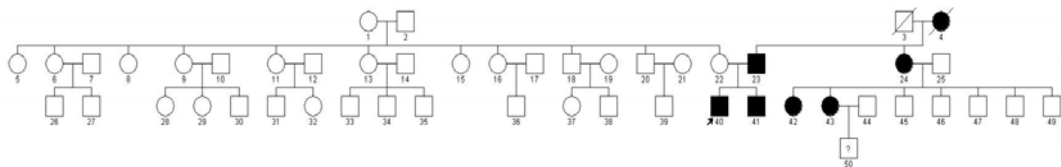
Família 35 – Foi considerada autossômica dominante apesar dos indivíduos 1 e 2 não estarem afetados. Essa informação poderia estar errada e não pôde ser comprovada (falecidos).



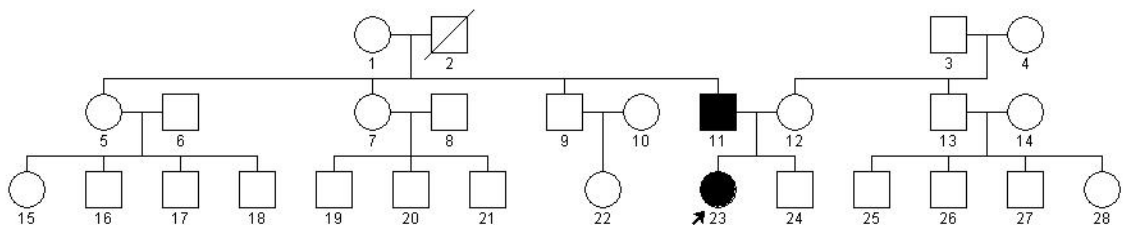
Família 36 – Padrão dominante com penetrância incompleta porque o indivíduo 15 não é afetado.



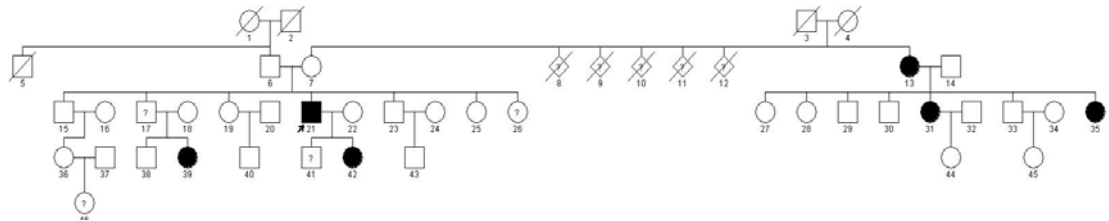
Família 37 – Padrão de herança autossômico dominante.



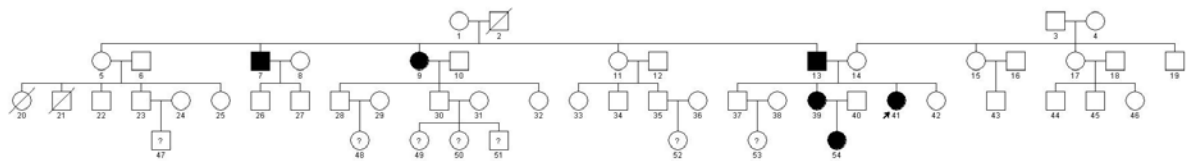
Família 38 – Padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta ou nova mutação no indivíduo 11, herdada pelo indivíduo 23.



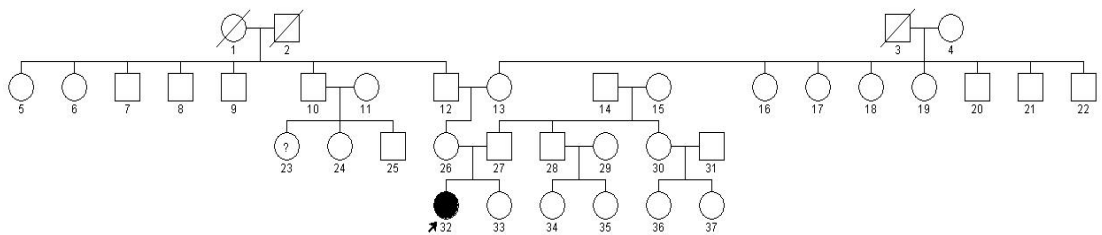
Família 39 – Padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta.



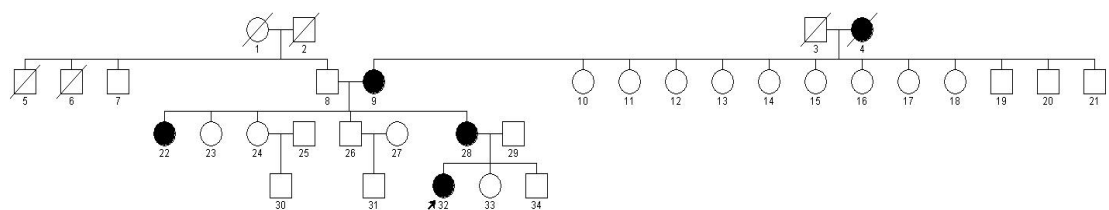
Família 40 – Padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta.



Família 41 – Somente a probanda é afetada, então poderia ser autossômica recessiva ou uma nova mutação.



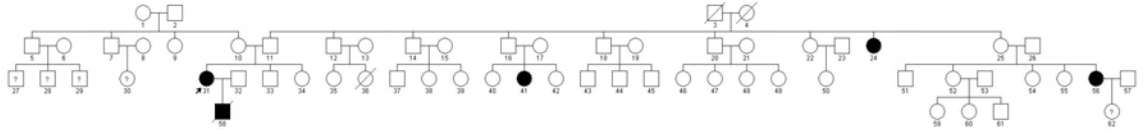
Família 42 – Modelo autossômico dominante.



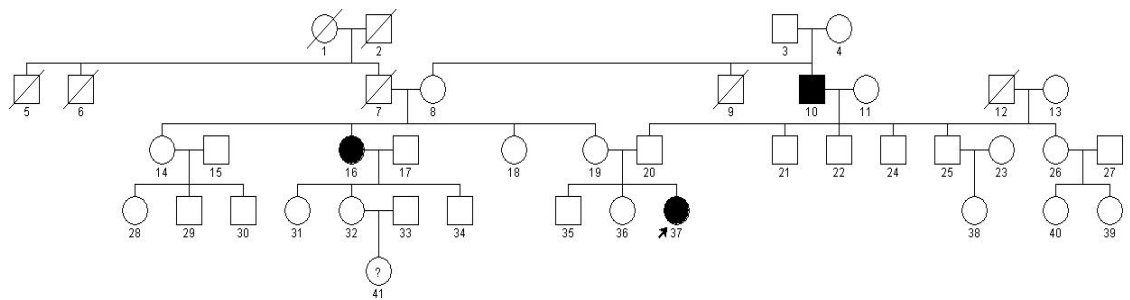
Família 43 – Padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta.



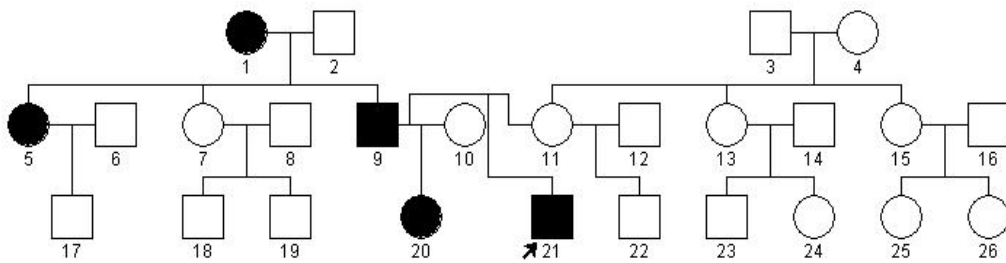
Família 44 – Padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta.



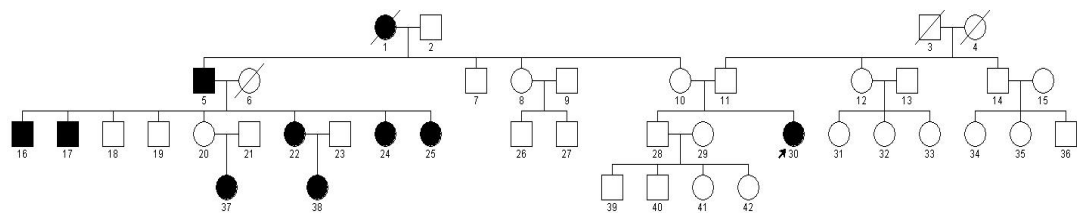
Família 45 – Padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta.



Família 46 – Padrão de herança autossômico dominante.

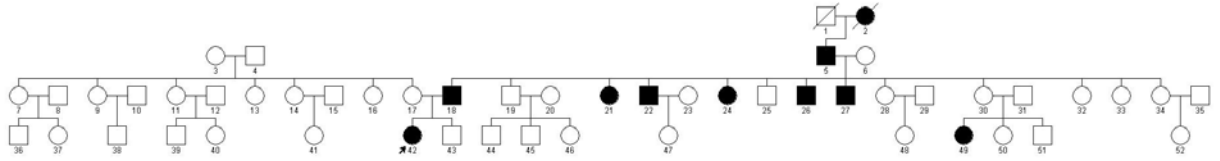


Família 47 – Padrão autossômico dominante com penetrância incompleta.





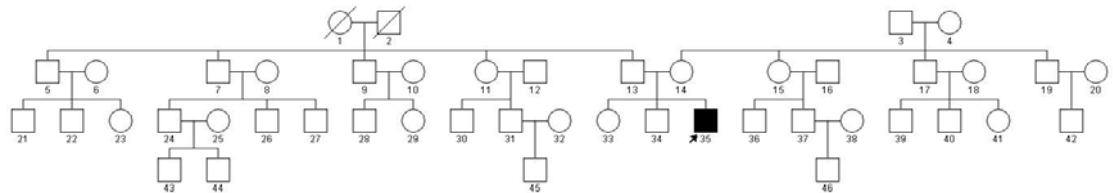
Família 48 – Padrão autossômico dominante com penetrância incompleta porque o indivíduo 30 não é afetado.



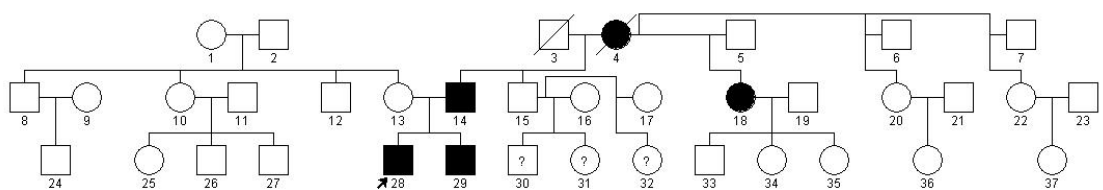
Família 49 – Padrão autossômico dominante com penetrância incompleta.



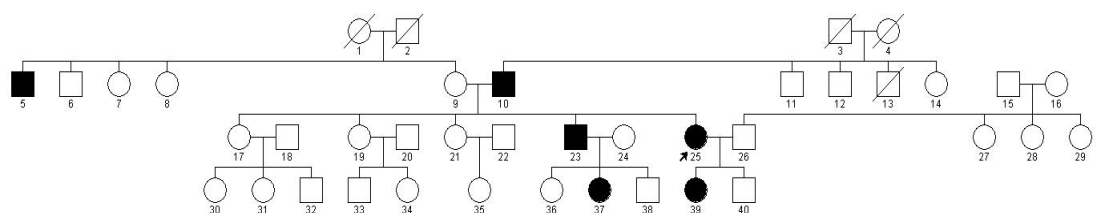
Família 50 – Padrão autossômico recessivo ou nova mutação.



Família 51 – Padrão autossômico dominante.



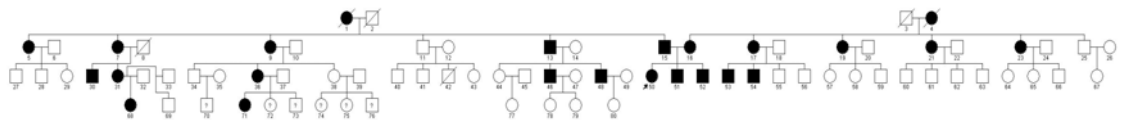
Família 52 – Prognatismo mandibular com um padrão autossômico dominante no lado direito do heredograma e provavelmente uma nova mutação ou um outro gene com um modelo autossômico recessivo no lado esquerdo do heredograma (indivíduo 5).



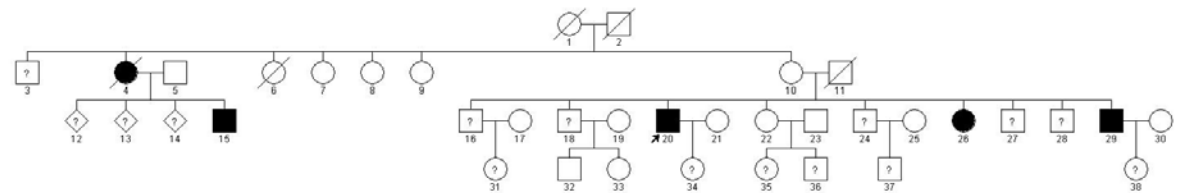
Família 53 – Padrão autossômico dominante com penetrância incompleta



Família 54 – Padrão autossômico dominante.



Família 55 – Padrão autossômico dominante com penetrância incompleta.



---

### **Anexo 3 – Protocolos de laboratório**

#### **PROCESSAMENTO DAS HEMÁCIAS PARA ARMAZENAGEM**

- 1) adicionar 1V de solução salina 0,9% e misturar no vórtex,
- 2) centrifugar a 80 rpm por 5',
- 3) desprezar o sobrenadante,
- 4) acrescentar 1V de solução tampão de eritrócitos com glicerol e misturar no vórtex,
- 5) armazenar em freezer.

#### **EXTRAÇÃO DE DNA - MÉTODO “SALTING OUT”**

##### **REAGENTES**

##### **Tampão A**

- 0,32M sacarose
- 10mM de Tris HCl pH 7,6
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1% de triton X 100

##### **Modo de preparo do tampão A**

- Misturar 109,5 g de sacarose, 10ml de Tris-HCl 1M pH7,6 e 5 ml de MgCl<sub>2</sub> 1 M
- Completar volume para 1 litro
- Autoclavar a solução
- Adicionar 10ml de triton X 100

##### **Tampão B**

- 25mM de EDTA pH 8
- 75 mM NaCl

##### **Modo de preparo do tampão B**

- Misturar 50ml de EDTA pH 8,0 e 40 ml de NaCl 5 M

**Solução saturada de NaCl**

Dissolver 35 gramas de NaCl em 100ml de água deionizada.

Se a solução não saturar, adicionar 2 gramas de NaCl e misturar

Repetir o procedimento até satura a solução

**SDS 10%**

10 gramas de SDS

Água deionizada qsp 100ml

**PROCEDIMENTOS**

- 1) volume inicial de sangue - 200µl – adicionar 200 µl de tampãoA,
- 2) homogeneizar/misturar e manter em gelo por 2',
- 3) centrifugar a 3000 rpm por 15',
- 4) descartar o sobrenadante com cuidado para não perder o pellet,
- 5) ressuspender o pellet em 200 µl de tampão A e levar ao vórtex,
- 6) misturar e manter em gelo por 2',
- 7) centrifugar a 3000 rpm por 15',
- 8) descartar o sobrenadante com cuidado para não perder o pellet,
- 9) ressuspender o pellet em 200 µl de tampão B,
- 10) homogeneizar/misturar no vórtex,
- 11) adicionar 20 µl de SDS 10% e 2,2 µl de proteinase K (estoque de 10mg/ml),
- 12) homogeneizar e incubar a 37°C overnight ou 55°C durante 60' em banho seco,
- 13) adicionar 70 µl de NaCl saturado (aproximadamente 6M) e agitar no vórtex por 15",
- 14) centrifugar a 4000 rpm por 15',
- 15) transferir o sobrenadante para outro microtubo de polipropileno,
- 16) adicionar 2V de etanol absoluto ou isopropanol 100% (temperatura ambiente),
- 17) inverter o tubo até precipitar DNA,
- 18) centrifugar a 5000 rpm por 3',

- 19) descartar o etanol e deixar o restante de etanol evaporar (tubos invertidos sobre papel toalha),
- 20) ressuspender em 100  $\mu$ l de TE (Ph 8,0),
- 21) homogeneizar manualmente,
- 22) incubar a 37°C durante 1 hora, em banho seco.

### QUANTIFICAÇÃO DO DNA (gel de agarose 1%)

#### Reagentes:

- Cuba pequena (30ml) – 0,3g agarose  
30ml de TBE 1X  
4 a 5  $\mu$ l de brometo de etídio
- Cuba média (200ml) – 2g agarose  
200ml de TBE 1X  
35  $\mu$ l de brometo de etídio.

#### Procedimento:

- 1) pesar a agarose e colocar no erlenmeyer,
- 2) adicionar TBE 1X,
- 3) misturar e levar ao microondas até dissolver (2' para gel médio e 30" para gel pequeno),
- 4) deixar esfriar sob água corrente,
- 5) acrescentar o brometo de etídio,
- 6) homogeneizar e verter na cuba,
- 7) colocar os pentes e deixar geleificar,
- 8) remover os pentes e aplicar as amostras em cada poço (3  $\mu$ l de tampão de carregamento e 5  $\mu$ l de DNA),
- 9) usar marcadores de DNA  $\lambda$  para 20ng/ $\mu$ l, 100ng/ $\mu$ l, 200ng/ $\mu$ l e 400ng/ $\mu$ l,
- 10) ligar a corrente elétrica a 100V e deixar correr por 45',
- 11) observar as bandas sob luz UV e calcular a concentração do DNA.

## DILUIÇÃO DOS 'INICIADORES'

Preparo da solução de estoque a 100 $\mu$ M:

- 1) concentração inicial: 10000 $\mu$ M (10.000pmol),
- 2) Dar spin até 13000 rpm,
- 3) Adicionar 100  $\mu$ l de TE,
- 4) Levar rapidamente ao vórtex e dar novo spin,
- 5) Incubar em banho seco a 37° C por 1 hora,
- 6) Armazenar no freezer.

Preparo da solução de trabalho a 10  $\mu$ M:

- 1) Pipetar 5  $\mu$ l de solução de estoque (100  $\mu$ M),
- 2) Adicionar 45  $\mu$ l de TE,
- 3) Homogeneizar (vórtex + spin),
- 4) Armazenar no freezer.

**ANEXO 4*****Dados da análise de ligação por marcador por família***

TABELA I – *Lod scores* para o marcador D1S234, para cada família analisada (1 a 10), para um determinado conjunto de valores para  $\theta$ .

<b>Famílias</b>	<b>Valores de <math>\theta</math></b>						
	0,00	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
1	-1,92	-0,91	-0,32	-0,11	0,01	0,02	0,01
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00
4	-2,40	-2,32	-1,64	-1,12	-0,59	-0,30	-0,11
5	-0,27	-0,26	-0,22	-0,18	-0,11	-0,07	-0,03
6	-2,63	-1,38	-0,72	-0,44	-0,19	-0,08	-0,02
7	-2,40	-1,36	-0,71	-0,44	-0,19	-0,08	-0,02
8	-6,20	-2,78	-1,45	-0,91	-0,41	-0,17	-0,04
9	-0,05	-0,05	-0,05	-0,06	-0,07	-0,06	-0,04
10	0,02	0,01	-0,01	-0,03	-0,03	-0,02	-0,01
<b>Total</b>	<b>-15,84</b>	<b>-9,04</b>	<b>-5,12</b>	<b>-3,28</b>	<b>-1,57</b>	<b>-0,73</b>	<b>-0,25</b>

TABELA II – *Lod scores* para o marcador D4S3038, para cada família analisada (1 a 10), para um determinado conjunto de valores para  $\theta$ .

Famílias	Valores de $\theta$						
	0,00	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
1	0,65	0,63	0,56	0,46	0,28	0,13	0,03
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,00	-0,00
4	0,12	0,12	0,11	0,10	0,08	0,05	0,03
5	-0,74	-0,71	-0,60	-0,49	-0,32	-0,18	-0,08
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,30	0,29	0,26	0,21	0,13	0,06	0,02
8	-2,01	-0,72	-0,14	0,03	0,09	0,04	0,01
9	0,07	0,07	0,05	0,03	-0,00	-0,02	-0,02
10	0,17	0,16	0,13	0,10	0,06	0,03	0,01
<b>Total</b>	<b>-1,44</b>	<b>-0,17</b>	<b>0,35</b>	<b>0,44</b>	<b>0,31</b>	<b>0,11</b>	<b>-0,01</b>



TABELA III – *Lod scores* para o marcador D6S1689, para cada família analisada (1 a 10), para um determinado conjunto de valores para  $\theta$ .

Famílias	Valores de $\theta$						
	0,00	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
1	-5,08	-2,82	-1,50	-0,94	-0,41	-0,16	-0,04
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,02	0,01
4	0,71	0,69	0,62	0,54	0,36	0,20	0,06
5	0,23	0,23	0,22	0,21	0,18	0,13	0,07
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,30	0,29	0,26	0,21	0,13	0,06	0,02
8	-3,55	-2,27	-1,11	-0,61	-0,21	-0,05	-0,01
9	0,57	0,55	0,50	0,44	0,32	0,20	0,09
10	-0,26	-0,24	-0,19	-0,13	-0,06	-0,02	-0,00
<b>Total</b>	<b>-7,06</b>	<b>-3,54</b>	<b>-1,15</b>	<b>-0,24</b>	<b>0,34</b>	<b>0,37</b>	<b>0,20</b>

TABELA IV - LOD SCORES para o marcador D7S503, para cada família analisada (1 a 10), para um determinado conjunto de valores para  $\theta$ .

Famílias	Valores de $\theta$						
	0,00	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
1	-1,88	-0,87	-0,28	-0,08	0,03	0,03	0,01
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,01	0,00
4	-2,21	-1,24	-0,61	-0,36	-0,15	-0,07	-0,03
5	-0,46	-0,42	-0,30	-0,21	-0,09	-0,03	-0,01
6	0,30	0,29	0,26	0,21	0,13	0,06	0,02
7	0,30	0,29	0,26	0,21	0,13	0,06	0,02
8	-3,77	-1,05	-0,42	-0,21	-0,06	-0,02	-0,00
9	0,36	0,35	0,31	0,27	0,18	0,11	0,05
10	-1,60	-1,15	-0,62	-0,38	-0,16	-0,66	-0,01
<b>Total</b>	<b>-8,94</b>	<b>-3,77</b>	<b>-1,39</b>	<b>-0,51</b>	<b>0,03</b>	<b>0,10</b>	<b>0,05</b>

TABELA V – *Lod scores* para o marcador D10S1483, para cada família analisada (1 a 10), para um determinado conjunto de valores para  $\theta$ .

Famílias	Valores de $\theta$						
	0,00	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
1	-4,10	-0,98	-0,34	-0,11	0,03	0,05	0,02
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,02	0,01
4	-0,50	-0,49	-0,43	-0,36	-0,23	-0,13	-0,05
5	0,10	0,10	0,08	0,06	0,03	0,01	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	-4,11	-1,38	-0,68	-0,40	-0,16	-0,06	-0,02
9	0,55	0,54	0,49	0,43	0,31	0,19	0,09
10	0,30	0,28	0,21	0,14	0,05	0,02	0,01
<b>Total</b>	<b>-7,73</b>	<b>-1,90</b>	<b>-0,63</b>	<b>-0,20</b>	<b>0,07</b>	<b>0,11</b>	<b>0,06</b>

TABELA VI – *Lod scores* para o marcador D19S566, para cada família analisada (1 a 10), para um determinado conjunto de valores para  $\theta$ .

Famílias	Valores de $\theta$						
	0,00	0,01	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
1	0,64	0,62	0,55	0,46	0,29	0,14	0,04
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,01	0,00
4	-2,50	-1,16	-0,50	-0,25	-0,04	0,03	0,04
5	-0,34	-0,33	-0,28	-0,24	-0,17	-0,11	-0,05
6	-1,37	-1,10	-0,65	-0,41	-0,18	-0,07	-0,02
7	0,30	0,29	0,26	0,21	0,13	0,06	0,02
8	-2,04	-0,80	-0,22	-0,04	0,02	0,01	-0,00
9	-2,21	-1,08	-0,46	-0,23	-0,06	-0,01	-0,00
10	-1,71	-1,19	-0,65	-0,42	-0,20	-0,09	-0,02
<b>Total</b>	<b>-9,21</b>	<b>-4,71</b>	<b>-1,94</b>	<b>-0,89</b>	<b>-0,19</b>	<b>-0,02</b>	<b>0,00</b>