



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO
PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA - MESTRADO



CAMILLA DE MARCHI SANCHES AZEVEDO

Associação de polimorfismos no gene *GRHL3* com fissuras de lábio e/ou palato
não-sindrômicas em uma população brasileira

Cascavel,
2019

CAMILLA DE MARCHI SANCHES AZEVEDO

Associação de polimorfismos no gene *GRHL3* com fissuras de lábio e/ou palato não-sindrômicas em uma população brasileira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia

Orientadora: Prof. Dra. Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel

Cascavel,
2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Azevedo, Camilla de Marchi Sanches Azevedo
Associação de polimorfismos no gene GRHL3 com fissuras de lábio e/ou palato não-sindrômicas em uma população brasileira / Camilla de Marchi Sanches Azevedo Azevedo; orientador(a), Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel Rangel, 2019.
65 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Graduação em Odontologia Programa de Pós-Graduação em Odontologia Ciências Aplicadas à Saúde, 2019.

1. Fissura labial. 2. Fissura palatina. 3. Fissura labiopalatina. 4. Polimorfismo genético. I. Rangel, Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel. II. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

CAMILLA DE MARCHI SANCHES AZEVEDO

Associação dos polimorfismos no gene GRHL3 com fissuras de lábio e/ou palato não-sindrômicas em uma população brasileira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Odontologia, área de concentração Odontologia, linha de pesquisa Patologia Aplicada À Clínica Odontológica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Joao Paulo de Arruda Amorim

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Renato Assis Machado

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Cascavel, 25 de março de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao amado mestre Jesus, por guiar meus passos, ouvir minhas preces, acalantar meu coração me dando forças para prosseguir e abençoar toda a minha trajetória.

Obrigada meus amados pais André e Ivone, que mesmo distantes fisicamente nossos corações sempre estiveram grudados, por todas as vezes que deixaram seus sonhos de lado, para dar asas aos meus. Esta conquista é de vocês e para vocês! “Amo tudo 6”!

Obrigada Mi, cabeça, por aturar todos os meus surtos e “gentilezas”, te amo!

Obrigada meu amor Marcelo, por estar comigo em todos os momentos, me apoiar e acreditar em mim até mesmo quando eu desacreditei... Te amo!

Agradeço minha orientadora Ana Lúcia, prof que me acolheu sem me conhecer, por toda a paciência e pelo aprendizado, acadêmico e para a vida...

Obrigada Renato, Renatim! Certamente sem você estas páginas não existiriam, jamais conseguirei agradecer sua dedicação, gentileza, disponibilidade e paciência. O mundo seria melhor se houvessem mais Renatos!

Gratidão Marlene por todos os incêndios mentais apagados, por todos os cafés, todos os “no final sempre dá certo”... Obrigada por me permitir conviver com esse lindo coração!

Gratidão eterna também a minha sócia, amiga, irmã, mãe Marli! Eu não encontro palavras para te agradecer, obrigada por tudo.... tudo!

Obrigada Elen e Adri, “45+2” por deixarem o fardo mais leve, as tardes mais divertidas e os almoços melhores!

Agradeço ao programa de pós-graduação em Odontologia da Unioeste, todos os professores e funcionários.

Agradeço ainda à UNICAMP, especialmente à figura do Prof Ricardo Della Coletta, quem apoiou esta pesquisa do início ao fim.

Gratidão às “profes” e direção da APOFILAB, pelas portas e braços abertos do primeiro ao último dia de pesquisa.

E final mas não menos importante, a todos os pacientes participantes do estudo, os quais depositaram total confiança neste trabalho, que seus passos sejam abençoados imensamente, e que as pesquisas futuras venham lhes beneficiar.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Desenvolvimento do lábio e palato	16
Figura 2 Fissuras orofaciais	17
Figura 3 Localização do gene <i>GRHL3</i> no cromossomo, no locus 1p36.11	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Origem das amostras deste estudo(n= 1127).....	29
Tabela 2 Características dos polimorfismos genéticos no gene <i>GRHL3</i> em 1p36.11.....	32
Tabela 3 Características demográficas dos pacientes com fissura de lábio e/ou palato não-sindrômica (FL/PNS) e do grupo controle.	34
Tabela 4 Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em <i>GRHL3</i> nos grupos controle e fissura palatina não-sindrômica (FPNS).....	36
Tabela 5 Análise dos haplótipos dos SNPs em <i>GRHL3</i> em pacientes controles e com fissura palatina não-sindrômica (FPNS).	37
Tabela 6 . Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em <i>GRHL3</i> nos grupos controle e fissura labial não-sindrômica (FLNS).	39
Tabela 7 Análise dos haplótipos dos SNPs em <i>GRHL3</i> em pacientes controle e com fissura labial não-sindrômica (FLNS).	41
Tabela 8 Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em <i>GRHL3</i> nos grupos controle e fissura de lábio e palato não-sindrômica (FLPNS).....	43
Tabela 9 Análise dos haplótipos dos SNPs em <i>GRHL3</i> em pacientes controles e com fissura de lábio e palato não-sindrômica (FLPNS)	44

Associação de polimorfismos no gene *GRHL3* com fissuras de lábio e/ou palato não-sindrômicas em uma população brasileira

RESUMO

As fissuras labiopalatais (FLP) são as malformações congênitas craniofaciais mais comuns, podendo apresentar-se associadas ou não a síndromes. A etiologia das FLPs, ainda que não totalmente elucidada, inclui fatores ambientais, genéticos e suas interações. Na tentativa de esclarecer tal questão, pesquisas têm investigado os genes associados as síndromes com ocorrência de fissuras em seu espectro clínico, sugerindo que a análise desses mesmos genes possa se estender para o grupo de fissuras não-sindrômicas. Este estudo teve como objetivo determinar a associação de polimorfismos contidos no gene *GRHL3* (*Grainyhead-like 3*) com a suscetibilidade para o desenvolvimento de FL/P em indivíduos não-sindrômicos, uma vez que este tem papel importante na formação da face, além de estar relacionado aos casos-sindrômicos de fissuras. Para tal, foi utilizada uma abordagem caso-controle com 833 casos de FL/PNS (fissura de lábio e/ou palato não-sindrômica), sendo 272 fissura palatina não-sindrômica - FPNS, 242 fissura labial não-sindrômica - FLNS e 319 fissura de lábio e palato não-sindrômica - FLPNS e 294 controles, provenientes de 5 regiões distintas do Brasil. O trabalho foi realizado a partir da coleta de células bucais obtidas através de bochecho com solução de sacarose 3%, nas quais, após o isolamento do DNA, foram realizados testes de ancestralidade genômica, bem como a genotipagem dos SNPs rs 10903078, rs 41268753 e rs 4648975 em *GRHL3*, a fim de investigar a existência de possíveis associações entre estes com o desenvolvimento de FL/PNS em uma amostra da população brasileira. Houve predominância para a ancestralidade europeia e uma associação significativa entre o SNP rs10903078 e a FLNS foi observada, entretanto não houveram associações entre este e os demais SNP quando relacionados para os demais tipos de fissura. A análise de regressão logística mostrou que o genótipo homocigoto CC de rs10903078 foi associado com FLNS (OR: 1,99; 95% IC: 0,83-1,78; $p=0.03$), assim como o haplótipo formado pelos alelos C-C dos SNPs rs10903078 e rs41268753 apresentou uma frequência aumentada no grupo com FLNS ($p= 0,04$), embora estas associações não tenham sido significantes após a correção de Bonferroni para comparações múltiplas.

Palavras chave: fissura labial, fissura palatina, polimorfismo genético.

Association of polymorphisms in the *GRHL3* gene with non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population

ABSTRACT

Cleft lip and palate (CLP) are the most common craniofacial congenital malformations, which may be associated or not with syndromes. The etiology of the CLPs, although not fully elucidated, includes environmental, genetic factors and their interactions. In an attempt to clarify such a question, researches have investigated the genes associated with the syndromes with occurrence of cracks in their clinical spectrum, suggesting that the analysis of these same genes may extend to the group of non-syndromic oral clefts. This study aimed to determine the association of polymorphisms contained in the *GRHL3* gene (Grainyhead-like 3) with susceptibility to the development of CL/P in non-syndromic individuals, since it plays an important role in the formation of the face, in addition to related to syndromic cases of oral clefts. For this purpose, a case-control approach was used with 833 cases of CL/PNS (non-syndromic cleft lip and/or palate), with 272 non-synchronous palatine fissure-CPNS, 242 non-syndromic cleft lip-CLNS and 319 non-synchronous cleft lip and palate- CLPNS and 294 controls, from 5 different regions of Brazil. The study was carried out from the collection of buccal cells obtained through mouthwash with sucrose solution 3%, in which, after DNA isolation, genomics ancestry tests were performed, as well as the genotyping of the SNPs rs 10903078, rs 41268753 and rs 4648975 in *GRHL3*, in order to investigate the existence of possible associations between these with the development of CL/PNS in a sample of the Brazilian population. There was predominance for European ancestry and a significant association between the rs10903078 SNP and CLNS was observed, however there were no associations between this and the other SNP when related to the other types of oral clefts. The logistic regression analysis showed that the homozygous CC genotype of rs10903078 was associated with CLNS (OR: 1.99; 95% CI: 0.83-1.78; $p = 0.03$), as well as the haplotype formed by the C-C alleles of the rs10903078 and rs41268753 SNPs presented an increased frequency in group with CLNS ($p = 0.04$), although these associations were not significant after Bonferroni correction for multiple comparisons.

Keywords: cleft lip, cleft palate, genetic polymorphism

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÕES	48
8 REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

As fissuras de lábio e/ou palato, caracterizadas por regiões de descontinuidade, representam o defeito craniofacial mais frequente em seres humanos (DIXON *et al.*, 2011; MARAZITA, 2012). Estas podem apresentar-se de forma isolada (FL/PNS) ou associadas a síndromes (LESLIE e MARAZITA, 2014). A classificação das FL/PNS se dá de acordo com a região anatômica envolvida e divide-se basicamente em 3 grupos: fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais (FL), fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP) e fissuras transforame incisivo ou fissuras lábio-palatais (FLP). Embriologicamente distintas, a FL ocorre na ausência da fusão das proeminências nasais e maxilares, enquanto a FP acontece quando os processos palatinos deixam de se fundir. Quando há falha concomitante nos dois processos ocorre a FLP (SHKOUKANI *et al.*, 2013; HOVORAKOVA *et al.*, 2018). Embriologicamente, a FL e FLP têm sido consideradas variantes do mesmo defeito que diferem somente quanto à severidade (LESLIE e MARAZITA 2014).

A prevalência das FL/PNS varia de acordo com o gênero do indivíduo, e a localização geográfica, havendo também a interferência de fatores ambientais. Sabe-se ainda que, estas anomalias afetam aproximadamente 1 em cada 500 a 2.500 nascidos vivos (MARAZITA *et al.*, 2002; DIXON *et al.*, 2011). De modo geral, a maior prevalência está nas populações asiáticas e ameríndias, com a incidência de 1:500, enquanto a população europeia é afetada de forma intermediária (1:1000) e as menores taxas de prevalência são observadas em africanos e descendentes de africanos, com a proporção de 1:2.500 nascidos vivos (MURTHY e BHASKAR, 2009; MOSSEY *et al.*, 2009). Em virtude da população brasileira ser altamente miscigenada, apresentando ancestralidade europeia, africana e ameríndia, a prevalência varia entre 0,36 a 1,46 casos para cada 1.000 nascidos vivos (MARTELLI-JÚNIOR *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Embora não seja uma das principais causas de mortalidade nos países desenvolvidos, as FL/PNS geram um índice considerável de morbidade às crianças afetadas e acrescem custos financeiros substanciais às famílias. Não obstante, os indivíduos afetados podem padecer com problemas na alimentação, fala, audição e integração social (NOPOULOS *et al.*, 2007; DIXON *et al.*, 2011), e recentemente, estudos tem alvitrado que pode haver maior risco de desenvolvimento de distúrbios mentais e psiquiátricos nos portadores de FLPs (LIMA *et al.*, 2015), reforçando o impacto

negativo desta malformação. Isto posto, surge a necessidade de melhor investigar as causas de tais defeitos.

Sabe-se que as FLPs são etiologicamente heterogêneas e tanto fatores ambientais como genéticos podem estar relacionados (DIXON *et al.*, 2011; MANGOLD *et al.*, 2011). Em 2007, Romitti *et al.*, através de um estudo de metanálise, encontraram que a exposição ocupacional dos pais aos pesticidas pode aumentar o risco dos descendentes apresentarem FLPs. Ainda neste contexto, Yang *et al.* (2014) também avaliaram a exposição a estas substâncias em uma área com altas taxas de sua utilização e concluíram que há relação positiva entre a exposição e fissuras orais. Assim como os herbicidas, outros fatores ambientais estão associados a maior incidência de FLPs, como por exemplo, o tabagismo. Estudos recentes apontam que mulheres fumantes têm risco aumentado para gerarem um filho portador de FLPs (DIXON *et al.*, 2011), fato este que pode ser aplicado tanto a fumantes passivas quanto às ativas, sendo que para as primeiras o risco quando comparado às não fumantes aumenta em 14% e para as fumantes ativas, há uma chance 27% maior de gerar um descendente com FLPs (KUMMET *et al.*, 2015). Embora em proporções menores, pode-se ainda associar a ingestão de bebidas alcoólicas na gestação como fator ambiental, sugerindo que a interação deste fator esteja relacionada ao tempo e à quantidade de álcool consumida (DIXON *et al.*, 2011). Ainda que controversos, estudos apontam para a utilização de ácido fólico como estratégia preventiva para o desenvolvimento das FLPs uma vez que há associação deste com efeitos de proteção às malformações no tubo neural (DIXON *et al.*, 2011). E ainda, o sobrepeso em gestantes também parece estar associado ao desenvolvimento das FLPs (SPINDER *et al.*, 2017).

Quanto à etiologia genética das FL/PNS, análises baseadas em diferentes estratégias estão sendo realizadas a fim de identificar possíveis genes envolvidos, incluindo estudos de ligação, caso-controle ou com trios, sequenciamento direto do DNA e também de associação de larga escala genômica (GWAS), que são baseados na comparação de vários polimorfismos genéticos comuns entre casos e controles (DIXON *et al.*, 2011; RAHIMOV *et al.*, 2012). Atualmente, estratégias abrangendo tanto o genoma completo quanto genes candidatos têm sido utilizadas na tentativa de elucidar o papel da genética na etiologia das FL/PNS (MARAZITA, 2002; KHANDELWAL *et al.*, 2013). A abordagem dos genes candidatos se dá com base no conhecimento prévio da patogênese das FL/P sindrômicas. Uma vez conhecida a semelhança fenotípica entre as formas sindrômicas e não-sindrômicas, acredita-se que os genes responsáveis pelos casos sindrômicos, possam ser genes candidatos para os casos não sindrômicos. Como exemplo,

a identificação de *IRF6* (*fator de regulação Interferon 6*) na Síndrome de Van der Woude (SVW) e FL/PNS é um exemplo típico da abordagem do gene candidato (ZUCCHERO *et al.*, 2004). Recentemente, o gene *GRHL3* (*Grainyhead-like 3*), localizado no *locus* 1p36 foi identificado como um novo gene causador da SVW (PEYRARD-JANVID *et al.*, 2014; MANGOLD, *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016). As mutações no gene *GRHL3* alteram o desenvolvimento da periderme bucal e são encontrados em famílias com SVW sem mutações em *IRF6*. Como um novo gene causador de FLP sindrômica, considera-se importante investigar o papel de *GRHL3* por trás das FL/PNS, ainda que a associação entre *GRHL3* com o desenvolvimento de FL/PNS permaneça desconhecida. As mutações em *GRHL3* com efeitos deletérios e patogênicos identificados em SVW são raras e, por conseguinte, parece improvável que seja prevalente entre grandes populações. No entanto, acredita-se que polimorfismos genéticos em comum podem contribuir para FL/PNS (WANG *et al.*, 2016). No primeiro estudo realizado para avaliar a associação com *GRHL3*, realizado por WANG *et al.*, (2016), foram selecionados marcadores para polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene *GRHL3*. Foram identificadas associações nominais de rs10903078 e rs4638975 com FL/PNS neste estudo de coorte, embora não tenham sido significantes após a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Até o momento não foram encontrados dados sobre esta associação com amostras nacionais.

Com base nestas informações, o presente estudo utilizou uma abordagem caso-controle com pacientes com FLNS, FLPNS e FPNS, foram analisados polimorfismos no gene *GRHL3* em 1127 amostras, sendo 833 casos divididos em FPNS (n=272), FLNS (n=242), FLPNS (n=319) e 294 controles provenientes de 4 regiões distintas do país. O trabalho foi partir da coleta de células bucais obtidas através de bochecho, nas quais foram realizados testes de ancestralidade genômica, e testadas a associação do SNPs rs-10903078, rs-41268753 e rs-4648975 em *GRHL3*, a fim de investigar a existência de possíveis associações entre estes com o desenvolvimento de FL/PNS na população brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo investigar a participação do gene candidato *GRHL3* no desenvolvimento de FL/PNS por meio da análise de polimorfismos em uma amostra brasileira.

2.2 Específicos

2.2.1 Determinar a associação de polimorfismos contidos no gene *GRHL3* (genótipos e haplótipos) com a suscetibilidade para o desenvolvimento de FPNS, FLNS e FLPNS.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fissuras do lábio e/ou palato não-sindrômicas (FL/PNS)

As fissuras orofaciais se caracterizam por regiões de descontinuidade em lábio e/ou palato e representam o defeito craniofacial mais frequente em seres humanos (DIXON *et al.*, 2011; MARAZITA *et al.*, 2012) e as FL/PNS representam mundialmente as malformações congênitas mais frequentes na região craniofacial (World Health Organization, 2014). Sabe-se que 70% das FL/Ps e 50% das FP apresentam-se de forma isolada, ou seja, sem outras malformações ou associadas a síndromes (JONES, 1988; MARAZITA *et al.*, 2002). Os demais casos representam a forma sindrômica, onde há associação com mais de 500 síndromes (DIXON *et al.*, 2011).

Os portadores de FL/PNS podem apresentar diversas alterações na estética facial, fala e audição, dificultando sua integração social, além do aumento significativo da morbidade associada, chegando a cerca de 30% em países subdesenvolvidos (NOPOULOS *et al.*, 2007; WEHBY *et al.*, 2011). Uma das primeiras complicações deste indivíduo é a dificuldade no aleitamento materno, acarretando em obstáculos para o ganho de peso e para o desenvolvimento da criança (MONTAGNOLI *et al.*, 2005). Pesquisas com pacientes fissurados em fase escolar registram alterações cognitivas que em sua maioria foram associadas a micro alterações na trajetória do crescimento e desenvolvimento das estruturas cerebrais (BRODER *et al.*, 1998; WEINBERG *et al.*, 2013). A literatura também tem sido taxativa ao reportar um risco maior na incidência de alguns tipos de câncer nos indivíduos afetados por FL/PNS, possivelmente devido a variações comuns nos genes que regulam o crescimento e o desenvolvimento tecidual (BILLE *et al.*, 2005; FREBOURG *et al.*, 2006; TAIOLI *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2011; KUCHLER *et al.*, 2014). Ainda relacionado ao desenvolvimento, as alterações na dentição, assim como diversas anomalias dentais, também têm sido cada vez mais investigadas e detectadas com maior frequência em indivíduos com FL/PNS (MELO-FILHO *et al.*, 2015; SÁ *et al.*, 2016; FERNANDEZ *et al.*, 2018). Não obstante, ainda há apontamentos para o impacto das FL/PNS na saúde mental dos afetados, indicando um maior risco para o desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos (LIMA *et al.*, 2015).

Todas estas complicações, reforçam o impacto negativo que as FL/PNS podem acarretar ao indivíduo, trazendo inúmeras consequências, diretas e indiretas na sua qualidade de vida, tanto nos aspectos individuais quanto familiares e sociais (WEHBY e CASSELL, 2010).

3.2 Embriogênese do lábio e palato e associação com FLPs

Para compreender melhor a complexidade das FLPs faz-se necessário atinar sobre o desenvolvimento da face, especialmente do lábio e palato. De acordo com Leslie e Marazita (2014), as FLPs ocorrem quando há falha em algum dos processos de formação craniofacial normal. Sabe-se que o desenvolvimento deste requer uma série bastante complexa de eventos que incluem crescimento, migração e diferenciação celular, assim como a apoptose. Em síntese, o desenvolvimento da face ocorre na 4ª semana de vida intra-uterina, quando as células da crista neural migram para formar os cinco primórdios da face: a proeminência frontonasal, os processos mandibulares (PMd) e os processos maxilares (PMx). Após a formação de proeminências faciais, os placóides nasais invaginam-se para formar os processos nasal medial (PNM) e lateral (PNL). Entre a 6ª e 7ª semana de gestação, o PNL se funde ao PMx formando o lábio superior e o palato primário. Havendo falha no crescimento ou na fusão destes processos ocorre a fissura orofacial que envolve o lábio superior, região alveolar e o palato primário. O palato secundário começa a se desenvolver na 7ª semana de embriogênese quando os processos palatinos (PP) emergem como conseqüências dos PMx. O PP inicialmente cresce verticalmente ao longo dos lados da língua em desenvolvimento, mas mais tarde eleva-se em uma posição horizontal. O crescimento contínuo faz com que o PP, se fusione à linha média. A fusão bem-sucedida do palato secundário resulta na separação completa das cavidades oral e nasal, permitindo a mastigação e a respiração simultaneamente. As fissuras palatais podem ocorrer em decorrência da falha de qualquer uma das várias etapas, incluindo a elevação do PP, migração ou fusão (MARAZITA e MOONEY, 2004; MOSSEY *et al.* 2009; DIXON *et al.*, 2011; LESLIE e MARAZITA, 2014; HOVORONAKOVA *et al.*, 2018), [Figura 1].

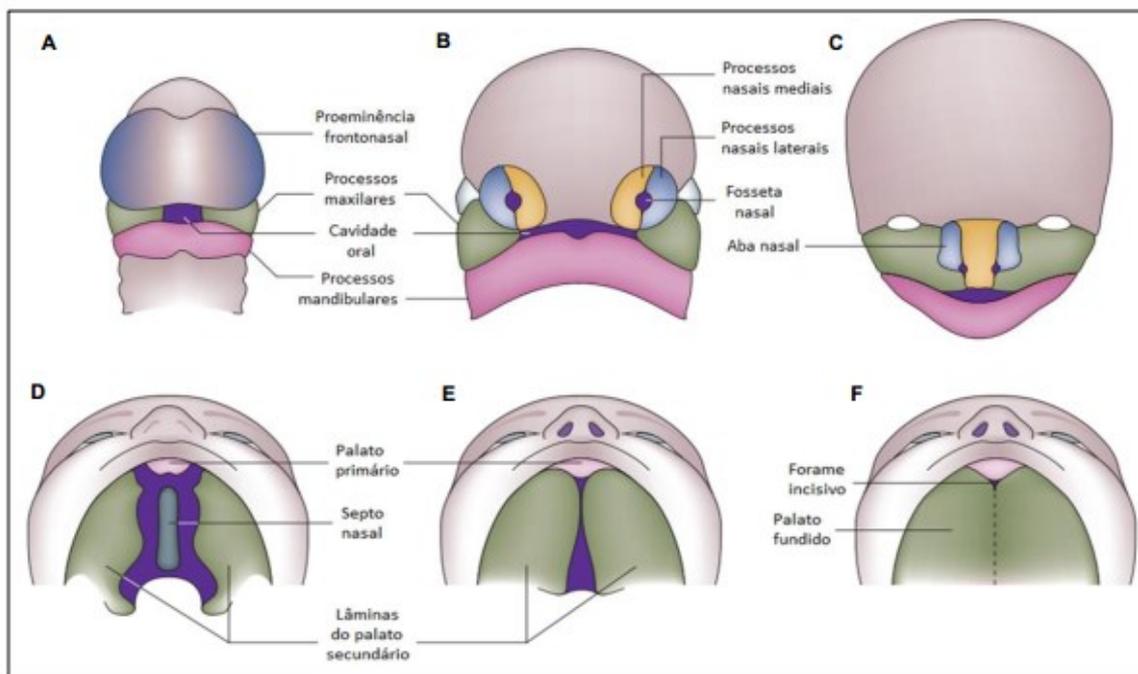


Figura 1 Desenvolvimento do lábio e palato

A, Desenvolvimento da proeminência frontonasal, processos mandibulares e maxilares, delimitando a cavidade oral primitiva na quarta semana de desenvolvimento. B, Na quinta semana, desenvolvimento das fossetas nasais e formação dos processos nasais medial e lateral. C, Fusão dos processos nasais medial e lateral ao processo maxilar e formação da parte central do lábio superior e palato primário. O processo lateral forma a asa do nariz; assim como os processos mandibulares se fundem formando a mandíbula. D, Na sexta semana de embriogênese, o palato secundário se desenvolve com o crescimento bilateral dos processos maxilares, que crescem verticalmente para baixo e para o lado da língua. E, posteriormente, os processos palatinos se elevam a uma posição horizontal acima da língua se unindo na linha média. F, Fusão dos processos palatinos, separando espaço oronasal em cavidade oral e nasal. Modificado a partir de Dixon et al., 2011.

Isto posto, a FL ocorre na ausência na fusão das proeminências nasais e maxilares, enquanto a FP acontece quando os processos palatinos deixam de se fundir, e quando há falha concomitante nos dois processos ocorre a FLP (SHKOUKANI *et al.*, 2013; HOVORAKOVA *et al.*, 2018), sendo que pode acontecer FL sem ocorrer concomitantemente a FP, bem como pode ocorrer somente a FP sem associação da FL, fato explicado pela diferença embrio-etiológica entre estas (DIXON *et al.*, 2011). Ainda, segundo Economou (2012), a gravidade da extensão da FL/P é relativa ao tempo, quantidade e gravidade na interrupção do desenvolvimento. Portanto, fatores genéticos e ambientais, que inibam o fluxo de células da crista neural ou diminuam o seu número, podem afetar as células, tornando o contato entre as proeminências faciais inadequado ou impossível. O epitélio que cobre o mesênquima pode não sofrer apoptose, impedindo a fusão dos placóides. Sendo assim, qualquer mudança na posição do placóide nasal ou

crescimento direcional anormal das proeminências faciais pode resultar em FLPs (Yu *et al.*, 2000).

3.3 Classificação das FL/PNS

A classificação das fissuras faciais não sindrômicas se categoriza de acordo com a região anatômica envolvida e a mais conhecida é a de Spina (1972) que as divide da seguinte forma:

- a. Fissuras pré -forame incisivo ou, simplesmente, fissuras labiais (FL);
- b. Fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP);
- c. Fissuras transforame incisivo ou fissuras labiopalatinas (FLP);
- d. Fissuras raras da face.

Mais recentemente, Mossey *et al.* (2009) propuseram outra classificação, onde pode-se identificar além do tipo de fissura, sua lateralidade. De acordo com os autores, as fissuras podem ser divididas em: A) fissuras labiais; B) fissuras palatinas; C) fissuras labiopalatinas incompletas unilaterais; D) fissuras labiopalatinas completas unilaterais e E) fissuras labiopalatinas completas bilaterais. Conforme exemplificado na Figura 2.

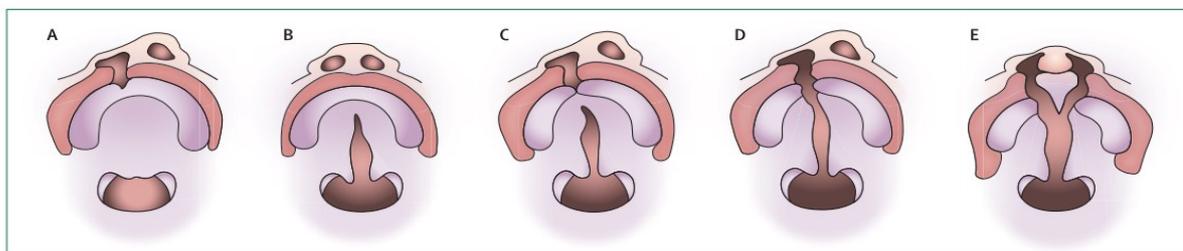


Figura 2 Fissuras orofaciais

3.4 Epidemiologia das FL/PNS

Inúmeros estudos, em diferentes países, têm revelado a diversidade epidemiológica das FL/PNS. Um dos pioneiros na pesquisa em pacientes fissurados foi o russo Frobelius, que entre os anos de 1833 a 1864, encontrou 118 casos de fissura, correspondente a uma prevalência de 0,065% para a população russa (CAPELOZZA e SILVA, 1994). Nos países subdesenvolvidos, os estudos sobre a prevalência das FL/PNS ainda são poucos quando comparados aos países mais desenvolvidos.

. Sabe-se ainda que, estas anomalias afetam aproximadamente 1 em cada 500 a 2.500 nascidos vivos (MARAZITA *et al.*, 2002; DIXON *et al.*, 2011) e a prevalência das FL/ PNS varia de acordo com a etnia, o gênero do indivíduo, a localização geográfica e a associação com fatores ambientais, sendo que ,de um modo geral, a ocorrência nas

populações asiáticas e ameríndias é maior, com a incidência de 1:500, enquanto a população europeia é afetada de forma intermediária (1:1000) e as menores taxas de prevalência são observadas em africanos e descendentes de africanos, com a proporção de 1:2.500 nascidos vivos. (MOSSEY e LITTLE, 2002; MURTHY e BHASKAR, 2009; MOSSEY *et al.*, 2009). Já para a população brasileira, a prevalência varia entre 0,36 a 1,46 casos para cada 1.000 nascidos, fato este que pode ser explicado pela miscigenação da população brasileira, que apresenta ancestralidade europeia, africana e ameríndia (MARTELLI-JÚNIOR *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Uma variação interessante na ocorrência das FL/PNS está relacionada ao gênero, sendo que as FL±P têm uma prevalência maior em indivíduos do gênero masculino, enquanto as FPs são mais frequentes no gênero feminino (MOSSEY *et al.*, 2009; MARTELLI *et al.*, 2012). Sabe-se ainda que cerca de 75% das fissuras labiais são unilaterais e o lado esquerdo é duas vezes mais afetado que o lado direito (GUNDLACH e MAUS, 2006). Ainda quando se compara o risco de FL em relação a FP, este é 2,19 vezes maior em homens quando relacionado a mulheres (MARTELLI *et al.*, 2012).

Quando avaliados os diferentes tipos de fissura e sua distribuição entre os grupos populacionais foram observadas interessantes variações (MOOSEY e LITTLE, 2002; VIEIRA, 2008; MOSSEY *et al.*, 2009). A frequência de FLP foi maior em algumas regiões da América Latina e Ásia (China e Japão) e menor em Israel, África do Sul e sul da Europa (MOSSEY e LITTLE, 2002), enquanto a FP isolada apresentou frequência elevada no Canadá e em partes do norte europeu, porém menores em algumas regiões da América Latina e África do Sul (MOSSEY e LITTLE, 2002; MATTHEWS *et al.*, 2015). Já no Brasil, observou-se maior frequência de FLP (39,7%), seguida por FL (38,1%) e pela FP (22,2%) (MARTELLI-JUNIOR *et al.*, 2007).

3.5 Fatores ambientais

Muitos fatores ambientais têm sido implicados como contribuintes negativos ao ambiente intra-uterino, incluindo a exposição da gestante ao álcool, cigarros, medicamentos (anticonvulsivantes, diazepam, fenitoína e fenobarbital), drogas ilícitas, infecções virais e deficiências nutricionais (KELLY, O'DOWLD e REULBACH, 2012). Embora tanto a mãe como o feto tenham a capacidade inata para lidar com diversas agressões ambientais por meio da ação de enzimas de desintoxicação, variantes deletérias desses genes podem reduzir a capacidade de biotransformar componentes tóxicos, tornando o feto mais vulnerável aos riscos teratogênicos (RAHIMOV *et al.*, 2012), sendo

que a complexidades dos mecanismos envolvidos se diferem quanto ao tipo, frequência e gravidade, resultando na diversidade das manifestações clínicas das fissuras (ECONOMOU *et al.*, 2012).

3.5.1 Tabagismo

Considerando a possível influência de fatores ambientais no desenvolvimento de FLPs, sabe-se que o tabagismo materno é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das FL/PNS (WYSZYNSKI *et al.*, 1997; LITTLE *et al.*, 2004; HONEIN *et al.*, 2007).

Há diversas pesquisas confirmando a associação do tabaco com FL/PNS entre estas, o trabalho de Little em 2004 que através de uma meta-análise, que incluiu 22 trabalhos publicados no período de 1966 a 2002 e evidenciou o risco de FL/PNS e o hábito do tabagismo. Com resultados similares, Leite e Koifman em 2009, em um estudo de caso-controle, avaliaram a associação entre história familiar de malformações com consanguinidade e o uso de tabaco e álcool, e também concluíram que o fumo e o álcool durante a gravidez aumentam o risco de FLP não-sindrômicas, assim como comprovaram existir uma forte associação entre FLPs e história familiar de malformações e consanguinidade. Não obstante, Zhang *et al.* (2011) também salientou uma forte associação entre tabagismo e FL/PNS em um estudo com 304 pacientes com FL/PNS de origem Chinesa. Ainda em 2011, Dixon *et al.* demonstraram que mulheres fumantes têm o risco aumentado para gerarem um filho portador de FLPs, fato este que ainda pode ser aplicado tanto às fumantes passivas quanto às ativas, sendo que para às primeiras o risco quando comparado às não fumantes aumenta em 14% e para as fumantes ativas, há uma chance 27% maior de gerar um descendente com FLPs (KUMMET *et al.*, 2015).

Contudo, existem divergências nos resultados sobre o papel do tabagismo no surgimento das FL/PNS. Entre as pesquisas que não constataram associação entre FL/PNS e tabagismo destacam-se estudos caso-controle realizados por Loffredo *et al.* (1994) e por Coutinho (2009). A associação entre o hábito materno de fumar na gestação e o desenvolvimento das FL/PNS também foi considerado inconsistente de acordo com Chevrier *et al.* (2008). Vale a pena salientar que a suscetibilidade ao cigarro depende da biotransformação dos compostos tóxicos na mãe e no embrião que muitas vezes não são facilmente tangíveis ou mensuráveis.

Evidencia-se ainda que o tabagismo na gestação também está associado às malformações dos membros, espinha bífida, prematuridade e baixo peso ao nascer (Wang

et al., 2014). Ainda com relação ao tabagismo, estudos recentes têm demonstrado associação entre o tabagismo e polimorfismos genéticos, bem como a influência de determinados genes que atuam nas vias de desintoxicação metabólicas no desenvolvimento das FL/PNS (CHEVRIER *et al.*, 2008; VAN DEN BOOGAARD *et al.*, 2008; JIANYAN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011; WU T *et al.*, 2012).

3.5.2 Etilismo

O álcool é considerado o teratôgeno mais consumido mundialmente e seu uso durante os períodos iniciais da gestação pode contribuir significativamente para o aparecimento de várias alterações congênitas (LEITE *et al.*, 2002). Embora em proporções menores que o tabaco, pode-se associar a ingestão de bebidas alcoólicas na gestação como fator ambiental, sendo que alguns trabalhos consideram significativa a contribuição do álcool para o desenvolvimento de FL/PNS (ROMITTI *et al.*, 1999; LORENTE *et al.*, 2000; CHEVRIER *et al.*, 2005; DEROO *et al.*, 2008; LEITE e KOIFMAN *et al.* 2009), sugerindo que a interação deste fator esteja relacionada ao tempo e à quantidade de álcool consumida (DIXON *et al.*, 2011). Contudo, há outros autores que consideram essa associação infundada (MEYER *et al.*, 2003; ROMITTI *et al.*, 2007b).

Alguns estudos recentes abordam a suscetibilidade genética e consumo de álcool. Romitti *et al.* (2007) observaram que a presença do alelo variante no gene *MSX1* (gene intensamente expresso na embriogênese facial) e o consumo de apenas uma dose semanal de bebida alcóolica pela mãe pode ser responsável por um aumento no risco de desenvolvimento de FL/PNS. Em 2010, Boyles *et al.* comprovaram atividade enzimática reduzida para este gene quando houve consumo de álcool, elevando o risco para FL/PNS.

Entretanto, o consumo do álcool pode estar associado a outros fatores de risco, como por exemplo desnutrição, tabagismo ou até mesmo estresse materno (LESLIE e MARAZITA, 2014).

3.5.3 Ácido fólico

Outra conhecida associação é a deficiência de ácido fólico e defeitos nas estruturas derivadas do tubo neural, como lábio e palato (ANTONY, 2007; BOYLES *et al.*, 2009). O ácido fólico, vitamina do complexo B, é essencial para a biossíntese de bases nitrogenadas e aminoácidos durante a divisão celular e crescimento tecidual, eventos iniciais necessários para a formação normal do tubo neural (ZEIGER e BEATY, 2002;

BLOM *et al.*, 2006). Com base nesses dados foi que alguns países introduziram a suplementação alimentar com ácido fólico de forma obrigatória. Há evidências de que o uso de multivitaminas no início da gravidez possa proteger o embrião contra fissuras orais, especialmente FLP (KELLY, O'DOWLD e REULBACH, 2012). Uma recente revisão na base de dados “*The Cochrane Library*” para revisões sistemáticas demonstrou que a ingestão de ácido fólico prévio e durante o início gestação, pode prevenir a ocorrência de defeitos do tubo neural. Entretanto, há estudos que não encontraram proteção ao risco de desenvolver FL/PNS quando houve suplementação com ácido fólico (RAY *et al.*, 2003; LOPEZ-CAMELO *et al.*, 2010; WEHBY e MURRAY, 2010). Embora o exato mecanismo da contribuição do ácido fólico no processo de fechamento total do tubo neural ser desconhecido, estima-se que mais de 70% dos defeitos do tubo neural podem ser impedidos pela suplementação materna com ácido fólico (KELLY, O'DOWLD e REULBACH, 2012).

3.5.4 Compostos químicos

Em 2007, Romitti *et al.*, através de um estudo de metanálise, encontraram que a exposição ocupacional dos pais aos pesticidas pode aumentar o risco dos descendentes apresentarem FLPs. Ainda neste contexto, Yang *et al.* (2014) também avaliaram a exposição a estas substâncias em uma área com altas taxas de sua utilização e concluíram que há relação positiva entre a exposição e fissuras orais.

Já em 2017, Spinder *et al.* testaram em um estudo de caso-controle envolvendo 679 casos, o risco de mães expostas a solventes, pesticidas e metais pesados em gerar filhos com FL/PNS e encontraram que as crianças do gênero masculino têm um risco maior a desenvolver fissuras quando as mães são expostas a solventes, enquanto crianças do gênero feminino tem maior propensão a ter fissura quando as mães estão expostas à poeira mineral. Ainda comprovaram um aumento significativo na prole fissurada quando a mãe trabalhou na agricultura ou foi exposta a pesticidas no primeiro trimestre de gestação.

3.6 Fatores genéticos

Diversos pesquisadores têm registrado ao longo dos anos uma possível interferência de fatores genéticos no aparecimento das FL/PNS. Fogh-Andersen (1942) foi o primeiro a observar em um estudo populacional a existência de um componente hereditário associado ao desenvolvimento das FL/PNS. Nas últimas décadas, alguns

estudos têm indicado recorrência familiar no desenvolvimento de FL/PNS (SIVERTSEN *et al.*, 2008; GROSEN *et al.*, 2010), embora não haja um padrão clássico de herança mendeliana identificado (NATSUME *et al.*, 2000; VIEIRA, 2008).

CURTIS *et al.* (1961) demonstraram que o risco de uma segunda ocorrência de FL/PNS em uma mesma família seria de 4% se a criança fosse afetada, 4% se os pais fossem afetados, 9% se existissem duas crianças afetadas e 17% se os pais e uma criança fossem afetados. Nota-se que famílias afetadas por um tipo de fissura não apresentam risco aumentado para outro tipo de fissura, refletindo assim as origens distintas de desenvolvimento de cada forma da anomalia (JUGESSUR e MURRAY, 2005). No entanto, ocasionalmente as FL±P e FP isoladas podem ocorrer dentro de uma mesma família, sugerindo que existe pelo menos alguma sobreposição na etiologia destes 2 tipos de fissuras (LESLIE e MARAZITA, 2014).

MARTELLI *et al.* (2010), através da avaliação da incidência familiar de FL/PNS em 185 pacientes, identificaram que 35,13% dos indivíduos apresentaram histórico familiar de FL/PNS, sendo os primos (54,37%) e os irmãos (21,05%) os mais afetados, independentemente do tipo de fissura. Em estudos com gêmeos, a taxa de concordância observada de 40% a 60% em gêmeos monozigóticos é muito maior do que a concordância de 3% a 5% identificada em gêmeos dizigóticos (JUGESSUR *et al.*, 2009). A alta taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos fornece evidências convincentes para um componente genético forte para as fissuras orofaciais. Por outro lado, se a etiologia das FL/PNS fosse apenas genética, seria esperado que a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos fosse de 100%; sugerindo que existem tanto fatores genéticos como ambientais envolvidos (DIXON *et al.*, 2011).

Estudos com abordagens distintas têm sido realizados com o objetivo de identificar os genes envolvidos no desenvolvimento de FL/PNS. Atualmente, estratégias abrangendo tanto o genoma completo quanto genes candidatos têm sido utilizadas na tentativa de elucidar o papel da genética na etiologia das FL/PNS (MARAZITA, 2009; KHANDELWAL *et al.*, 2013). A abordagem dos genes candidatos se dá com base no conhecimento prévio da patogênese das FL/P sindrômicas. Uma vez conhecida a semelhança fenotípica entre as formas sindrômicas e não-sindrômicas, acredita-se que os genes responsáveis pelos casos sindrômicos, possam ser genes candidatos para os casos não sindrômicos. A identificação de *IRF6* (*fator de regulação Interferon 6*) na Síndrome de Van der Woude (SVW) e FLP/NS é um exemplo típico da abordagem do gene candidato (ZUCCHERO *et al.*, 2004).

A série de genes candidatos para FL/PNS não é composta apenas por aqueles envolvidos no desenvolvimento das estruturas da face, mas também por aqueles que são influenciados por transtornos ambientais durante o desenvolvimento embriológico (PRESCOTT e MALCOLM *et al.*, 2002). Dentre os genes associados às FL/PNS, destacam-se: *IRF6* (fator de regulação interferon 6) (ZUCHERO *et al.*, 2004; BUFALINO *et al.*, 2010), *TGF α* (fator de crescimento transformante alfa), *MSX1* (Muscle Segment Homeobox), *TGF3* (fator de crescimento transformante beta 3), *JAG2* (*JAGGED2*), *FGF7* (fator de crescimento de fibroblasto 7), *FGF10*, *FGF18*, *FGFR1* (receptor do fator de crescimento de fibroblasto 1), *FGFR2*, *FGF8*, *BMP4*, *MYH9* (*myosin, heavy chain 9, non-muscle*), *MAFB*, *ARHGAP29*, *VAX1* (*ventral anterior home box*) e *PAX7* (VIEIRA, 2002; ZUCHERO *et al.*, 2004; MARAZITA *et al.*, 2009; BEATY, 2010; PAN *et al.*, 2011; LENNON *et al.*, 2012; LESLIE e MURRAY, 2013; LUDWIG *et al.*, 2012; BUTALI *et al.*, 2013).

Os resultados de mapeamento de muitos genes e estudos de associação do genoma de outros genes candidatos em potencial para o desenvolvimento de FL/PNS são considerados inconclusivos ou não têm sido replicados em diferentes estudos (MARAZITA e NEISWANGER, 2002). Além das diferentes populações de cada estudo, um motivo para a redução relativa da importância dos trabalhos pode estar relacionada ao fato de normalmente se utilizar apenas a presença de fissura como fenótipo. Trabalhos atuais têm mostrado uma avaliação ainda mais apurada e também têm sugerido que esses indivíduos podem apresentar outras características subclínicas e gravidade variável das fissuras, o que poderia indicar a presença de diferentes genes e fatores ambientais envolvidos na etiologia das FL/P (WEINBERG *et al.*, 2006; NEISWANGER *et al.*, 2006). Da mesma forma, os membros da família podem ser portadores de alelos com suscetibilidade para fissura, mas que não são suficientes para elevá-los acima do limiar e conduzir a um defeito, mas que pode resultar em sutis diferenças (NEISWANGER *et al.*, 2006). A presença de anomalias dentais, alterações musculares, incluindo defeitos no músculo orbicular da boca, anormalidades craniofaciais como alterações antropométricas do cérebro, assimetria facial e padrões de assimetria entre as mãos (WEINBERG *et al.*, 2006; NEISWANGER *et al.*, 2007; MARAZITA, 2007; LU *et al.*, 2009) têm sido relacionadas às FL/PNS e familiares, indicando portanto a existência de subfenótipos. O enriquecimento do fenótipo das FL/PNS pode guiar com maior precisão os estudos de genes com suscetibilidade para fissura (WEINBERG *et al.*, 2006).

Embora estudos anteriores de genes de ligação candidatos (geralmente aqueles relacionados ao desenvolvimento da face), e ainda mais recentemente, vários estudos de associação do genoma (GWAS), terem mostrado fatores de risco na arquitetura genética em múltiplos *loci* associados, o fator causal genético desta malformação permanece, em grande parte, desconhecido. Uma abordagem molecular significativa para estudar a influência genética em FLP/NS seria prosseguir com a investigação de genes envolvidos no desenvolvimento de FLP síndrômica (HE; BIAN, 2016).

Dentre os genes envolvidos no desenvolvimento da face, recentemente, o gene *GRHL3* (*Grainyhead-like 3*), localizado no *locus* 1p36 foi identificado como um novo gene causador da SVW (PEYRARD-JANVID *et al.*, 2014; MANGOLD, *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016). As mutações no gene *GRHL3* alteram o desenvolvimento da periderme bucal e são encontrados em famílias com SVW sem mutações em *IRF6*. Como um novo gene causador de FLP síndrômica, considera-se importante investigar o papel de *GRHL3* por trás das FL/PNS, pois a associação deste com o desenvolvimento das FL/PNS ainda permanece desconhecida.

3.6.1 *GRHL 3*

O gene Grainyhead Like Transcription Factor 3 (*GRHL3*) localizado no *locus* 1p36.11, inicia-se na base 24.319.322 e finaliza na base 24.364.482, apresentando um total de 45.161 bases, com orientação plus strand (Figura 3).

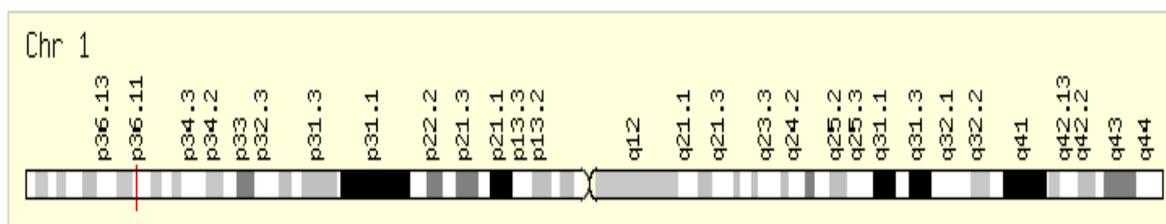


Figura 3 Localização do gene *GRHL3* no cromossomo, no locus 1p36.11 (Genecard, 2016).

A literatura tem mostrado que o gene *GRHL3* é um dos três membros da família de genes *Grainyhead-like* que regula a morfogênese e manutenção da epiderme em diversas espécies de mamíferos em milhões de anos de evolução (KUDRYAVTSEVA *et al.*, 2003). Este grupo de genes está predominantemente expresso na ectoderme de superfície (BOGLEV *et al.*, 2011) e a alteração da sua expressão durante o desenvolvimento embrionário pode levar à formação defeituosa da epiderme, assim como defeitos no processo de reparação de feridas, defeitos na adesão celular e fissura dorsal (ATTARDI *et al.*, 1993; OSTROWSKI *et al.*, 2002; MACE *et al.*, 2005; NARASIMHA

et al., 2008). Ele ainda desempenha papéis em outros dispositivos de fechamento epiteliais, inclusive para cura e reparo de feridas em vertebrados (BOGLEV, 2011).

Em humanos, as mutações no gene *GRHL3* alteram o desenvolvimento da periderme bucal e são encontrados em famílias com VWS sem mutações em *IRF6*. Como um novo gene causador de FLP sindrômica, considera-se investigar o papel de *GRHL3* na causa das FL/PNS, apesar da associação entre *GRHL3* com o desenvolvimento de FL/PNS permanecer desconhecido. As mutações em *GRHL3* com efeitos deletérios e patogênicos identificados na SVW são raras e, por conseguinte, parece improvável que seja prevalente entre grandes populações. No entanto, acredita-se que polimorfismos genéticos em comum podem contribuir para FL/PNS (WANG *et al.*, 2016).

Leslie *et al.* (2016) identificaram, através de um estudo GWAS uma associação significativa entre a FPNS e polimorfismos em *GRHL3*. Este estudo contou com dois grupos distintos, sendo um composto por 165 trios e o outro por 78 casos de FP e 1.700 indivíduos controle sem história familiar de malformações craniofaciais e todos com ancestralidade européia. Eles encontraram que rs41268753 é uma mutação *missense* em *GRHL3* que aumenta o risco para FP, com um risco de ocorrência (OR) de 2,16. Os autores sugerem ainda que a associação de FP com rs41268753 possa ter 3 possíveis variantes etiológicas neste *locus*, sendo, (1) rs41268753 é a variante etiológica; (2) a variante etiológica é uma variante comum não observada na ligação de desequilíbrio com rs41268753; ou (3) rs41268753 apresenta um haplótipo comum com penetrância incompleta, assim como encontrado em SVW. Relatam ainda, em ensaios com zebrafish que permitiram-lhes determinar que rs41268753 interfere na função normal de ativação transcricional do GRHL, sendo uma provável variante etiológica para FP em humanos.

Ainda em 2016, Wang *et al.* investigaram a presença de polimorfismos em *GRHL3* em uma população chinesa. Este estudo de caso-controle contou com 504 casos de portadores de FL/PNS e 455 controles, nos quais foram genotipados 10 SNPs de *GRHL3* a fim de testar a associação com FL/PNS. Dentre estes 10 polimorfismos, apenas 2 (rs10903078 e rs4638975) apresentaram significância estatística, porém não resistiram à correção de Bonferroni.

Mangold *et al.* (2016) realizaram o sequenciamento da região codificadora do *GRHL3* e encontraram mutações raras e uma variante comum para FPNS. Este grupo realizou o sequenciamento em 576 portadores de FL/P e 96 portadores de FP, em uma população de ancestralidade europeia. Encontraram que em pacientes portadores de FPNS há uma maior frequência do alelo menor (MAF) para rs41268753 quando

comparados aos controles. Sugerem ainda que as mutações dominantes em *GRHL3* são mais suscetíveis a causar fissuras palatinas não sindrômicas do que sindrômicas, no caso da SVW.

Ainda em 2016, He & Bian testaram as possíveis relações entre variantes funcionais em *GRHL3* e FPNS em uma população chinesa, justificada pela alta prevalência de fissuras orofaciais nesta população. Inicialmente o SNP rs 41268753 foi testado, entretanto não foi detectado este tipo de variação alélica, então, redirecionaram o estudo para pesquisa dos SNP com MAFs >5% na população chinesa, analisando portanto os SNPs rs 2486668 e rs 545809, contudo não houve comprovação do risco aumentado destes polimorfismos para FL/PNS.

No momento estão sendo realizados estudos com *GRHL3* e a população africana como o trabalho de Eshete *et al.* (2018) no qual testaram variantes de *GRHL3* em um estudo caso-controle com 134 casos de FPNS e encontraram mutações em *GRHL3* associadas a estas fissuras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo incorporou os aspectos éticos recomendados pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, incluindo entre outros a obtenção do consentimento livre e esclarecido dos indivíduos, e não apresentou atividades que pudessem causar danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual dos envolvidos. Quanto aos estudos desenvolvidos em crianças e adolescentes foram obtidas as concordâncias dos mesmos assim como de seus responsáveis legais. Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, o qual é vinculado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Ministério da Saúde (MS) e aprovado sob número de parecer 2.087.154 (Anexo 1).

4.2 Desenho do estudo

Este estudo utilizou uma abordagem caso-controle com pacientes com FLNS, FLPNS e FPNS com correção para diferenças de ancestralidade de cada indivíduo.

4.3 Amostras

Foram incluídas neste estudo 1127 amostras, sendo 833 casos divididos em FPNS (n=272), FLNS (n=242), FLPNS (n=319) e 294 controles provenientes de 5 regiões distintas do país: o Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade José do Rosário Vellano (Centro Pró-Sorriso), localizado em Alfenas, Minas Gerais; a Associação Portadores de Fissura Labial localizada na cidade de Cascavel, Paraná (APOFILAB); o Hospital Santo Antônio das Obras Assistenciais Irmã Dulce (OAID), Salvador, Bahia, o Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba e o Hospital Ophir Loyola (HOL), Belém, Pará. Todos os pacientes com FL/PNS passaram por entrevista através de questionário padrão (Anexo 2) e examinados pelas equipes multidisciplinares de cada centro e apenas pacientes com a forma não-sindrômica de FL/P foram incluídos. Os pacientes com história de consanguinidade ou com história familiar de fissura oral também não foram incluídos neste estudo (Tabela 1).

O grupo controle caracterizou-se por amostras provenientes das mesmas regiões supracitadas e apenas pacientes sem alterações congênitas e/ou história familiar de FL/P

foram incluídos. A proporção dos pacientes do grupo controle seguiu a mesma proporção de acordo com a idade e cor de pele/raça do grupo de estudo.

Tabela 1 Origem das amostras deste estudo(n= 1127)

	<i>Centro Pró- Sorriso, Alfenas- MG</i>	<i>Hospital OAID, Salvador-BA</i>	<i>APOFILAB , Cascavel- PR</i>	<i>HULW, João Pessoa-PB</i>	<i>HOL, Belém-PA</i>	<i>TOTAL</i>
FLNS	120	71	17	12	22	242
FLPNS	145	88	52	34	-	319
FPNS	98	131	32	5	6	272
Controle	104	95	49	46		294
<i>Total</i>	<i>467</i>	<i>385</i>	<i>150</i>	<i>97</i>	<i>28</i>	<i>1127</i>

OIAD: Obras Assistenciais Irmã Dulce, APOFILAB: Associação dos Portadores de Fissura Labial, HULW: Hospital Universitário Lauro Wanderley, HOL: Hospital Ophir Loyola.

4.4 Coleta das amostras de células bucais

As amostras de células bucais foram coletadas por meio de bochecho, por 60 segundos com 5 mL de uma solução aquosa de sacarose a 3%. O conteúdo resultante do bochecho foi transferido para um tubo de 15 mL, o qual continha o volume de 3 mL de uma solução 66% alcoólica contendo 17 mM Tris-HCl pH 8,5 mM NaCl e 7 mM EDTA. Esta etapa foi realizada por pesquisadores previamente calibrados, em cada um dos 5 centros participantes.

4.5 Isolamento do DNA

Esta e as sucessivas etapas foram realizadas no laboratório de biologia molecular e celular da Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP.

A cada tubo foi adicionado água destilada e deionizada autoclavada q.s.p. 15 mL. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado e centrifugado em solução aquosa, contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl e 7 mM EDTA. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 1 mL de solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, incubado a 50°C por 1 hora, após este tempo foi adicionado 10 µl de proteinase K (Invitrogen, USA) e incubado em movimento contínuo semicircular. Após 16 horas de incubação, foram adicionados 470 µl de uma solução aquosa de 8M de acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 14.000 rpm a 4°C. O precipitado de DNA foi adquirido após adição de 540 µl isopropanol ao sobrenadante e centrifugado (14.000 rpm por 5 min a 4°C). Para o término da purificação foi adicionado 1mL de etanol 70% gelado e centrifugado (14.000 rpm por 5 min a 4°C), removido o sobrenadante, seco e ressuspensionado em tampão Tris-EDTA. A determinação da concentração e pureza das amostras foram determinadas por espectrofotometria utilizando a razão 260/280 nm. Onde valores inferiores a 1,7 indica contaminação com proteína e valor superior a 2 indica contaminação com RNA.

4.6 Estimativa da ancestralidade genômica

Para determinar a ancestralidade genômica de cada indivíduo, as amostras foram genotipadas em um conjunto de 40 polimorfismos de inserção/deleção bialélicos (indels) previamente validados como marcadores informativos para ancestralidade (Bastos-Rodrigues *et al.*, 2006). Essa análise teve como objetivo evitar associações falsas, já que as frequências de determinados polimorfismos podem ser diretamente influenciadas pela etnia. Isso é especialmente importante em populações miscigenadas como a população brasileira. Assim, a análise foi realizada considerando as proporções de ancestralidade de cada indivíduo. Em essência, as reações de PCR multiplex foram realizadas com 5 a 7 pares de primers por reação, escolhidos com base no tamanho dos alelos. A cada primer forward foi adicionada uma cauda de M13 e um primer forward complementar a M13 ligado ao fluoróforo FAM foi também utilizado. A reação, de volume final de 10 μ l, consistiu de 1 μ l 10X PCR Buffer, 0,8 μ l dNTPs (2,5 mM), 0,2 μ l Taq polimerase (5 U/ml), 4,95 μ l H₂O Milli-Q, 2 μ l DNA (50 ng) e 0,75 μ l da mistura de primers. A mistura de primers continha 33 μ M da mistura de primers forward específicos (partes iguais de cada um), 100 μ M do primer forward complementar a M13 ligado ao fluoróforo FAM e 100 μ M da mistura de primers reverse (partes iguais). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 45 e 72°C 45s, 9 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 45 s e 72°C 45 s, seguido por final extensão a 72°C por 30 min. Após as reações de amplificação, os produtos foram diluídos para subsequente análise no sequenciador automático ABI3500 DNA Analyser (Applied Biosystems). A reação consistiu em 8,925 μ l de Formamida HI-DI, 0,075 μ l do marcador de peso molecular GS600 e 2 μ l do produto da PCR diluído 10 vezes. A análise dos fragmentos foi realizada com o programa GeneMapper Software Version 4.0.

4.7 Seleção dos polimorfismos genéticos

Este estudo selecionou polimorfismos no gene *GRHL3* previamente descritos em associação a FL/PNS (LESLIE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016). A Tabela 2 resume as características gerais dos polimorfismos selecionados.

4.8 Genotipagem pelo método de discriminação alélica com sondas fluorescentes

As reações de genotipagem foram realizadas utilizando o sistema de discriminação alélica com sondas fluorescentes. Todos os polimorfismos apresentaram primers e sondas, sistema TaqMan® da Applied Biosystems (USA). A sonda é constituída de fluoróforo que ligado na extremidade 5' (Reporter) é responsável pela emissão da fluorescência e um composto que bloqueia a emissão desta fluorescência durante a extensão a partir do primer sense. As reações foram realizadas no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, USA) em uma reação de 5 µl contendo 2,5 µl de 2x Genotyping Master Mix, 0,12 µl da mistura de primers e sondas e 2 ng DNA, os quais foram diluídos em 2,38 µl de água livre de DNase e RNase. Os parâmetros de amplificação foram: 1 ciclo de 30 s a 60°C e 10 min a 95°C (desnaturação inicial) e 40 ciclos de 15 s a 92°C e 1 min a 60°C (estágio de amplificação), os quais foram seguidos por 1 ciclo de 30 s a 60°C.

Tabela 2 Características dos polimorfismos genéticos no gene *GRHL3* em 1p36.11.

SNP	Posição	MAF	Alelos
rs10903078	24,332,945	0.261	T/C
rs41268753	24,342,967	0.009	C/T
rs4648975	24,343,774	0.270	A/G

MAF: Frequência do alelo menor. Alelo variante em negrito. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

4.9 Análises estatísticas

A existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada como descrito por Rodrigues *et al.* (2009). Para determinar a ancestralidade genômica de cada indivíduo, o software Structure 2.3.4 foi utilizado em um modelo assumindo três populações parentais com base na origem tri-híbrida da população brasileira (européia, populações de

referência africanos subsaariana e ameríndios de Marshfield Clinic Collection). Os modelos de regressão logística múltipla sob modelos genéticos aditivos, dominantes e recessivos, considerando o gênero e a ancestralidade genômica como potenciais covariáveis, foram realizados com os pacotes SNPassoc e Haplo.stats no software RStudio.

O software Haploview (versão 4.2) foi usado para estimar o desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs no gene *GRHL3*.

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para verificar se existe uma diferença na idade e ancestralidade entre os grupos, enquanto que o teste qui-quadrado foi utilizado para comparar a distribuição do gênero dos voluntários entre os grupos. Nas comparações, valores de $p < 0,05$ foi considerado indicativo de diferença estatisticamente significativa.

5 RESULTADOS

Foram analisados polimorfismos no gene *GRHL3* em 1127 amostras, sendo 833 casos divididos em FPNS (n=272), FLNS (n=242), FLPNS (n=319) e 294 controles. A idade média dos grupos controle e de estudo se mostrou similar (p=0,39), e houve predominância da ancestralidade europeia, seguido da africana e depois ameríndia, conforme é apresentado na Tabela 3. A prevalência do gênero masculino foi observada nos pacientes com FLNS (53,3%) e FLPNS (55,5%) e do gênero feminino nos pacientes com FPNS (61,4%) e no grupo controle (66,7%). As diferenças entre os gêneros mostraram-se estatisticamente significantes e para sua correção juntamente com a diferença de ancestralidade de cada paciente, utilizamos o teste de associação com análise de regressão logística múltipla.

Tabela 3 Características demográficas dos pacientes com fissura de lábio e/ou palato não-sindrômica (FL/PNS) e do grupo controle.

	Controle (n=294)	FPNS (n=272)	FLNS (n=242)	FLPNS (n=319)	Valor de <i>P</i>
Idade	24,51 ± 12,25	13,90 ± 11,28	18,38 ± 12,98	20,36 ± 14,65	0,39*
Gênero					
Masculino	98 (33,3%)	105 (38,6%)	129 (53,3%)	177 (55,5%)	0,0001#
Feminino	196 (66,7%)	167 (61,4%)	113 (46,7%) ^a	142 (44,5%)	
Ancestralidade					
Européia	88,1%	82,5%	81,2%	81,2%	0,99*
Africana	9,8%	15,2%	17,2%	17,0%	
Ameríndia	2,0%	2,3%	1,6%	1,8%	

*Valor de *P* calculado com o teste de Kruskal-Wallis, e #Valor de *P* calculado com teste de χ^2 .

Quanto aos SNPs estudados, a distribuição de todos os genótipos avaliados se mostrou consistente no grupo controle de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste de associação foi realizado inicialmente com o grupo com fissura palatina não-sindrômica e não houve diferença estatística tanto nas distribuições de genótipos como de alelos e haplótipos de SNPs em *GRHL3* dos casos estudados conforme mostram as Tabelas 4 e 5. Os genótipos possíveis para cada SNPs foram testados em relação ao percentual de alelos diferentes entre controle e fissura palatina (OR alelo) bem como para

o percentual de heterozigotos (OR het), percentual de homozigotos (OR homo) comparando ao total de controles e ainda foi comparado o genótipo dominante (OR dom) e o genótipo recessivo (OR rec) em relação ao somatório dos genótipos dominantes e recessivos, porém nenhum foi significativo do ponto de vista estatístico.

Tabela 4 Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em GRHL3 nos grupos controle e fissura palatina não-sindrômica (FPNS)

	HWE Valor de <i>P</i>	Controle (n=294)	FPNS (n=272)	OR _{alelo} (95% IC) / Valor de <i>P</i> *	OR _{Het} (95% IC) / Valor de <i>P</i>	OR _{Hom} (95% IC) / Valor de <i>P</i>	OR _{Dom} (95% IC) / Valor de <i>P</i>	OR _{Rec} (95% IC) / Valor de <i>P</i>
rs10903078 (TT/TC/CC)	0,84	57,5/36,4/6,1	55,9/36,6/7,5	1,08 (0,82-1,42) / 0,55	1,10 (0,76-1,57) / 0,62	1,33 (0,67-2,63) / 0,42	1,13 (0,80-1,59) / 0,48	1,28 (0,66-2,50) / 0,46
rs41268753 (CC/CT/TT)	0,69	95,6/4,4/0,0	94,1/5,5/0,4	1,43 (0,69-2,98) / 0,32	1,32 (0,61-2,86) / 0,47	-	1,41 (0,66-3,03) / 0,37	-
rs4648975 (AA/AG/GG)	0,21	56,1/35,7/8,2	56,0/37,7/6,3	0,95 (0,73-1,25) / 0,74	1,10 (0,77-1,57) / 0,60	0,86 (0,44-1,68) / 0,62	1,06 (0,75-1,48) / 0,75	0,83 (0,43-1,59) / 0,57

*Valor de *P* calculado com o teste de χ^2 e ajustados para co-variáveis por análise de regressão logística; HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5 Análise dos haplótipos dos SNPs em GRHL3 em pacientes controles e com fissura palatina não-sindrômica (FPNS).

SNPs	Haplótipo	Controle	FPNS	Valor de <i>P</i>
rs10903078, rs41268753 e rs4648975				
	T-C-A*	63,9%	64,7%	
	C-C-G	15,3%	17,4%	0,31
	T-C-G	10,5%	7,6%	0,18
	C-C-A	7,9%	7,0%	0,72
	C-T-A	1,0%	1,6%	0,55
	T-T-A	1,0%	1,5%	0,43
rs10903078 e rs41268753				
	T-C*	74,4%	72,5%	
	C-C	23,4%	24,3%	0,42
	T-T	1,2%	1,6%	0,55
	C-T	0,9%	1,5%	0,43
rs10903078 e rs4648975				
	T-A*	64,9%	66,2%	
	C-G	15,3%	17,4%	0,35
	T-G	10,7%	7,7%	0,17
	C-A	9,0%	8,7%	0,91
rs41268753 e rs4648975				
	C-A*	71,7%	71,6%	
	C-G	26,0%	25,2%	0,91
	T-A	2,2%	3,1%	0,30

Valor de *P* foi ajustado por co-variáveis por análise de regressão logística *Haplótipos normais.

Posteriormente foram realizadas as análises com as FLNS e FLPNS levando-se em consideração os mesmos padrões acima citados. Uma associação significativa entre o SNP rs10903078 e a FLNS foi observada. A análise de regressão logística mostrou que o genótipo homozigoto CC foi associado com FLNS (OR: 1,99; 95% IC: 0,83-1,78; $p=0.03$), como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 . Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em GRHL3 nos grupos controle e fissura labial não-sindrômica (FLNS).

	HWE Valor de <i>P</i>	Controle (n=294)	FLNS (n=242)	OR _{alelo} (95% IC) / Valor de <i>P</i> *	OR _{Het} (95% IC) / Valor de <i>P</i>	OR _{Hom} (95 IC) / Valor de <i>P</i>	OR _{Dom} (95% IC) / Valor de <i>P</i>	OR _{Rec} (95% IC) / Valor de <i>P</i>
rs10903078 (TT/TC/CC)	0,84	57,5/36,4/6,1	53,2/36,5/10,3	1,24 (0,94-1,63) / 0,12	1,22 (0,83-1,78) / 0,29	1,99 (1,01-3,91) / 0,03 [#]	1,33 (0,93-1,90) / 0,12	1,84 (0,95-3,56) / 0,06
rs41268753 (CC/CT/TT)	0,69	95,6/4,4/0,0	97,8/2,2/0,0	0,49 (0,17-1,38) / 0,17	0,51 (0,18-1,49) / 0,20	-	-	-
rs4648975 (AA/AG/GG)	0,21	56,1/35,7/8,2	56,7/36,7/6,7	0,94 (0,71-1,25) / 0,70	1,12 (0,77-1,63) / 0,56	0,91 (0,46-1,82) / 0,80	1,08 (0,76-1,54) / 0,66	0,87 (0,44-1,71) / 0,68

*Valor de *P* calculado com o teste de χ^2 e foram ajustados para co-variáveis por análise de regressão logística.

; HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. [#]Diferença estatística

Com relação às análises dos haplótipos, aquele formado pelos alelos C-C dos SNPs rs10903078 e rs41268753 apresentou uma frequência aumentada no grupo com FLNS comparado com o controle ($p=0,04$) (Tabela 7), contudo os valores de p não resistiram ao teste de múltiplas correções de Bonferroni.

Tabela 7 Análise dos haplótipos dos SNPs em GRHL3 em pacientes controle e com fissura labial não-sindrômica (FLNS).

SNPs	Haplótipo	Controle	FLNS	Valor de <i>P</i>
rs10903078, rs41268753 e rs4648975				
	T-C-A*	64,0%	64,0%	
	C-C-G	15,3%	18,3%	0,10
	T-C-G	10,5%	6,4%	0,08
	C-C-A	7,9%	10,2%	0,21
	T-T-A	1,0%	0,6%	0,71
	C-T-A	1,0%	0,2%	0,21
rs10903078 e rs41268753				
	T-C*	74,4%	70,9%	
	C-C	23,4%	28,0%	0,04 [#]
	T-T	1,3%	0,6%	0,38
	C-T	0,9%	0,5%	0,58
rs10903078 e rs4648975				
	T-A*	64,9%	64,6%	
	C-G	15,3%	18,5%	0,08
	C-A	9,0%	10,4%	0,42
	T-G	10,7%	6,4%	0,06
rs41268753 e rs4648975				
	C-A*	71,8%	74,0%	
	C-G	26,0%	24,9%	0,92
	T-A	2,2%	1,0%	0,21

Valor de *P* foi ajustado por co-variáveis por análise de regressão logística. *Haplótipos normais;

[#]Diferença estatística.

Conforme mostram as Tabelas 8 e 9 não houve associações significantes em genótipos e haplótipos para as FLPNS.

..

Tabela 8 Distribuição dos genótipos dos polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em GRHL3 nos grupos controle e fissura de lábio e palato não-sindrômica (FLPNS)

	HWE Valor de <i>P</i>	Controle (n=294)	FLPNS (n=319)	OR _{alelo} (95%IC) / Valor de <i>P</i> *	OR _{Het} (95% IC) / Valor de <i>P</i>	OR _{Hom} (95 IC) / Valor de <i>P</i>	OR _{Dom} (95% IC) / Valor de <i>P</i>	OR _{Rec} (95% IC) / Valor de <i>P</i>
rs10903078 (TT/TC/CC)	0.84	57,5/36,4/6, 1	55,2/37,2/7, 6	1,10 (0,85- 1,43) / 0,45	1,11 (0,78- 1,56) / 0,55	1,38 (0,71-2,66) / 0,34	1,15 (0,83- 1,59) / 0,41	1,32 (0,70- 2,52) / 0,39
rs41268753 (CC/CT/TT)	0.69	95,6/4,4/0,0	96,5/3,5/0,0	0,78 (0,34- 1,76) / 0,55	0,79 (0,34- 1,83) / 0,58	-	-	-
rs4648975 (AA/AG/GG)	0.21	56,1/35,7/8, 2	54,2/39,8/6, 0	0,99 (0,76- 1,28) / 0,94	1,22 (0,86- 1,72) / 0,26	0,83 (0,43-1,60) / 0,55	1,15 (0,83- 1,59) / 0,40	0,77 (0,41- 1,45) / 0,41

*Valor de *P* calculado com o teste de χ^2 e ajustados por co variáveis para análise de regressão logística; HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 9 Análise haplótipo dos SNPs em GRHL3 em pacientes controles e com fissura de lábio e palato não-sindrômica (FLPNS)

SNPs	Haplótipo	Controle	FLPNS	Valor de <i>P</i>
rs10903078, rs41268753 e rs4648975				
	T-C-A*	64,0%	64,5%	
	C-C-G	15,3%	16,8%	0,43
	T-C-G	10,5%	8,8%	0,70
	C-C-A	7,9%	8,2%	0,67
	T-T-A	1,0%	0,5%	0,37
	C-T-A	1,0%	1,0%	0,80
rs10903078 e rs41268753				
	T-C*	74,4%	73,4%	
	C-C	23,4%	24,9%	0,42
	T-T	1,3%	0,4%	0,19
	C-T	0,9%	1,3%	0,55
rs10903078 e rs4648975				
	T-A*	64,9%	65,0%	
	C-G	15,3%	17,1%	0,37
	C-A	9,0%	9,2%	0,67
	T-G	10,7%	8,7%	0,63
rs41268753 e rs4648975				
	C-A*	71,8%	72,4%	
	C-G	26,0%	25,9%	0,77
	T-A	2,2%	1,7%	0,60

Valor de *P* foi ajustado por co-variáveis por análise de regressão logística.

*Haplótipo normal.

6 DISCUSSÃO

As diversas dificuldades que os portadores de FL/PNS encontram no decorrer da vida, assim como a alta morbidade têm estimulado nos últimos anos muitos estudos genéticos com o objetivo de ampliar o conhecimento dos fatores de risco para o desenvolvimento destas (DIXON *et al.*, 2011; STUPPIA *et al.*, 2011; RAHIMOV *et al.*, 2012). Atualmente diversos genes e regiões cromossômicas já foram associados às FL/PNS, embora ainda não haja completa elucidação sobre sua etiologia. A distribuição dos polimorfismos e haplótipos assim como suas correlações com as FL/PNS variam amplamente entre as diferentes populações, fazendo com que estudos de validação de suscetibilidade e associação sejam essenciais para melhorar a compreensão da complexidade desta anomalia de origem multifatorial (PARANAIBA *et al.*, 2013; AQUINO *et al.*, 2014).

Em relação ao tipo de fissura e gênero, tanto à literatura mundial quanto à brasileira apontam para uma prevalência ao gênero masculino de FL/PNS e de FPNS ao gênero feminino (FREITAS *et al.*, 2004; MARTELLI-JUNIOR *et al.*, 2007; MOSSEY *et al.*, 2009), o que também foi observado no presente estudo, sendo que 53,3% dos casos de FLNS e 55,5% dos casos de FLPNS ocorreram no gênero masculino, ao passo que 61,4% dos casos de FPNS ocorreram no gênero feminino. Este fato pode ser explicado devido ao palato do embrião feminino se desenvolver em média uma semana mais tarde que o masculino, aumentando a predisposição à ação de fatores nocivos em seu desenvolvimento (LARY *et al.*, 2001). E embora não haja confirmação, sugere-se que os genes localizados no cromossomo X tenham papel importante na etiologia das fissuras (JUGESSUR *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2013).

A fim de evitar a estratificação populacional, para este estudo foram obtidas amostras de 4 regiões diferentes do país e a variabilidade genômica/ancestralidade de cada indivíduo foi levada em consideração. A prevalência europeia foi seguida da africana e esta pela ameríndia, tanto no grupo de estudo como no grupo controle, confirmando estudos anteriores realizados com a população brasileira (PENA *et al.*, 2011; FILEZIO *et al.*, 2013; AQUINO *et al.*, 2014).

Vale a pena salientar que, durante o levantamento epidemiológico por meio de entrevista e preenchimento de questionário padrão (anexo 2) foram anotadas diversas

exposições a fatores ambientais de risco como por exemplo tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxicos e/ou a utilização de ácido fólico, porém é difícil mensurar a real exposição e participação destes na formação das fissuras. Além do mais, estes dados não estão disponíveis para o grupo controle, tornando difícil prever a real participação destes na etiologia das fissuras. Sugere-se portanto, que para os próximos estudos seja elaborado um questionário padrão para o grupo controle, a fim de melhor elucidar e relacionar a interação destes fatores em amostras nacionais. Outra sugestão seria incluir no questionário informações referentes à exposição paterna aos fatores de risco, visto que Sulh *et al.* (2018) avaliaram, em seu estudo de caso-controle, tanto a exposição materna quanto a paterna aos pesticidas, encontrando forte associação com as fissuras, especialmente as FP.

Como anteriormente descrito, mutações em *GRHL3* alteram o desenvolvimento da periderme bucal e são encontradas em famílias com SVW sem mutações em *IRF6*. Como um novo gene causador de FLP sindrômica, considera-se importante investigar o papel de *GRHL3* na causa das FL/PNS (WANG *et al.*, 2016).

Baseado nesse contexto, Leslie *et al.* (2016) realizaram um estudo GWAS em portadores de FPNS e associaram ao SNP rs 41268753 um risco aumentado para o desenvolvimento de FP em pacientes com ancestralidade europeia (OR 2,16 e $p=4,08 \times 10^{-9}$) entretanto, quando testaram o mesmo SNP em uma população multiétnica, o valor de p reduziu consideravelmente ($p=2,75 \times 10^{-8}$) indicando que há interferência da ancestralidade e a população europeia está mais suscetível ao risco nesta interação Mangold *et al.* (2016) também encontraram associação significativa deste SNP em portadores de FP ($p = 1,24 \times 10^{-2}$). Diferentemente, no presente estudo, não houve a comprovação da interação deste SNP na população testada, que embora tenha apresentado um OR sugestivo de risco (1,43), não demonstrou significância estatística ($p=0,32$), fato que pode ser justificado pelo poder da presente amostra, que embora conte com um número expressivo de indivíduos não apresenta poder suficiente.

Entretanto, no mesmo trabalho de Mangold *et al.* (2016), não foram encontradas associações em rs-41268753 com FL/PNS, em concordância com o presente trabalho ($p = 0,45$ para ambos).

Já Wang *et al.* (2016) encontraram associações das FL/PNS em dois diferentes SNPs (rs 10903078 e rs 4638975) na população chinesa, embora não tenha apresentado resultados significantes após a correção de Bonferroni. No presente estudo não foi

possível observar tal associação, sendo que para a população brasileira testada não houve diferenças estatísticas ($p = 0,20$ para rs 10903078 e $p = 0,33$ para rs 4638975). Sugerindo-se assim que esta falta de interação ocorre pelo fato da ancestralidade da amostra utilizada contar com poucos indivíduos orientais.

Uma nova interação, até então não relatada na literatura, foi encontrada entre rs10903078 e FLNS ($p = 0,03$), fato este que pode ser justificado por haver poucos estudos associando exclusivamente FLNS a este SNP.

É fundamental frisar que a real interação entre estas variantes polimórficas analisadas e o risco para FL/PNS não está bem elucidada e os resultados permanecem inconclusivos.

Conclui-se que a identificação de novas regiões polimórficas, em genes candidatos como o *GRHL3*, relacionadas às FL/PNS são de suma importância para a compreensão dessa anomalia, haja visto a inédita descoberta do SNP rs10903078 associado com FLNS obtida na presente pesquisa. Este fato indica que este é um campo promissor para investigações futuras. Sendo assim, o presente resultado deve incentivar trabalhos futuros, principalmente com amostras maiores, a fim de contribuir para a melhor compreensão dos eventos genéticos envolvidos na etiologia desta complexa alteração do desenvolvimento.

7 CONCLUSÕES

- 1 Não houve associação entre SNP rs10903078, rs41268753 rs4648975 e as FPNS na população avaliada;
- 2 Para a população avaliada houve associação significativa no genótipo homozigoto CC do SNP rs10903078 no risco de FLNS, porém os valores de p não são resistentes a correção de Bonferroni;
- 3 Houve uma frequência aumentada do haplótipo formado pelos alelos C-C dos SNPs rs10903078 e rs41268753 no grupo FLNS em comparação ao grupo controle;
- 4 Não houve associação entre SNP rs10903078, rs41268753 rs4648975 e as FLPNS na população testada.

8 REFERÊNCIAS

ANTONY, A. C. **In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development.** American Journal of Clinical Nutrition. v. 85, n. 2, 2007, p. 598-603.

AQUINO SN, MESSETTI AC, HOSHI R, BORGES A, VIENA CS, REIS SR, et al. **Analysis of susceptibility polymorphisms for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population.** Birth Defects Research 2014 Jan;100(1):36-42.

ATTARDI, L.D.; VON SEGGERN, D.; TJIAN, R.; **Ectopic expression of wild-type or a dominant-negative mutant of transcription factor NTF-1 disrupts normal Drosophila development.** Proceedings of the National Academic of Science. v. 90, s.n., United States, 1993 p. 10563–10567.

BASTOS-RODRIGUES L, PIMENTA JR, PENNA SD. **The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms.** Annal of Human Genetics. 2006;70:658-65.

BEATY, T. H.; MURRAY, J. C.; MARAZITA, M. L. et.al. **A 91 genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4.** Nature Genetics. v. 42, n. 6, p. 525-29, 2010.

BILLE C, WINTHER JF, BAUTZ A, MURRAY JC, OLSEN J, CHRISTENSEN K. **Cancer risk in persons with oral cleft--a population-based study of 8,093 cases.** American Journal of Epidemiology.2005; 161(11): 1047-55.

BLOM, H. J.; SHAW, G. M.; DEN HEIJER, M. *et al.* **Neural tube defects and folate: case far from closed.** Nature Reviews Neuroscience.v. 7, n. 9, 2006 p. 724 -731.

BOGLEV, Y.; WILANOWSKI T.; CADDY J. **The unique and cooperative roles of the Grainy head-like transcription factors in epidermal development reflect unexpected target gene specificity.** Developmental Biology. v. 349, s.n., United States, 2011 p. 512–522.

BOYLES AL, BALLARD JL, GORMAN EB, MCCONNAUGHEY DR, CABRERA RM, WILCOX AJ,et al. **Association between inhibited binding of folic acid to folate receptor alpha in maternal serum and folate-related birth defects in Norway.** Human Reprod. 2010;26(8): 2232-8.

BOYLES, A. L.; WILCOX, A. J.; TAYLOR,J. A. *et al.* **Oral facial clefts and gene polymorphisms in metabolism of folate /one -carbon and vitamin A: a athway-wide association study.** Genetic Epidemiololy .v. 33, n. 3, , 2009 p. 247-255.

BRODER HL, RICHMAN LC, MATHESON PB. **Learning disability, school achievement, and grade retention among children with cleft: a two-center study.** Cleft Palate Craniofacial Journal. 1998; 35(2): 127-31.

BUFALINO A, RIBEIRO PARANAIBA LM, NASCIMENTO DE AQUINO S, MARTELLI-JUNIOR H,OLIVEIRA SWERTS MS, COLETTA RD. **Maternal polymorphisms in folic acid metabolicgenes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population.** Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2010; 88(11): 980-6.

BUTALI A, SUZUKI S, COOPER ME. *et al.* **Replication of genome wide association identified candidate genes confirm the role of common and rare variants in PAX7**

and VAX1 in the etiology of nonsyndromic CLP. American journal of medical genetics. May; 2013;161A(5):965-72

CHEVRIER C, PERRET C, BAHUAU M, NELVA A, HERMAN C, FRANCANET C, et al. **Interaction between the ADH1C polymorphism and maternal alcohol intake in the risk of nonsyndromic oral clefts: an evaluation of the contribution of child and maternal genotypes.** Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2005; 73(2): 114-22.

CHEVRIER, C.; BAHUAU, M.; PERRET, C.; *et al.* **Genetic susceptibilities in the association between maternal exposure to tobacco smoke and the risk of nonsyndromic oral cleft.** American journal of medical genetics. Part A. v. 146, n. 18, , United States, 2008 p. 2396-406.

COUTINHO ALF. LIMA MC, KITAMURA MAP, NETO JF. PEREIRA RM. **Perfil epidemiológico dos portadores de fissuras orofaciais em um Centro de Referência do Nordeste do Brasil.** Revista Brasileira Materno Infantil. 2009; Recife 9(2):149-56.

CURTIS, E. J.; FRASER, C.; WARBURTON, D. **Congenital cleft lip and palate, risk figures for counseling.** American journal of diseases of children. v. 102, n. 6, p. 853-857, United States, 1961.

DEROO LA, WILCOX AJ, DREVON CA, LIE RT. **First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based casecontrol study.** American Journal of Epidemiology. 2008; 168(6): 638-46.

DIXON, M. J.; MARAZITA, M. L.; BEATY, T. H.; MURRAY, J. C. **Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences.** Nature reviews Genetics. v. 12, n. 3, . England, Mar/2011 p. 167-78.

ECONOMOU AD, OHAZAMA A, PORNTAVEETUS T, SHARPE PT, KONDO S, BASSON MA, et al. **Periodic stripe formation by a Turing mechanism operating at growth zones in the mammalian palate.** Nature Genetics. 2012; 44(3): 348-51.

ESHETE MA, LIU H, LI M, ADEYEMO WL, GOWANS LJJ, MOSSEY PA, BUSCH T et al. **Loss-of-Function GRHL3 Variants Detected in African Patients with Isolated Cleft Palate.** Journal of Dental Research. 2018 Jan;97(1):41-48

FILEZIO MR, BAGORDAKIS E, DE AQUINO SN, PEREIRA MESSETTI AC, MARTELLI-JUNIOR H, SWERTS MS, et al. **Polymorphisms in GABRB3 and oral clefting in the Brazilian population.** DNA Cell Biol. 2013; 32(3): 125-9.58

FREBOURG T, OLIVEIRA C, HOCHAIN P, KARAM R, MANOUVRIER S, GRAZIADIO C, et al. **Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer.** Journal of Med Genet. 2006; 43(2): 138-42.

FREITAS JA, DALBEN GDA S, SANTAMARIA M, JR., FREITAS PZ. **Current data on the characterization of oral clefts in Brazil.** Brazilian Oral Research. 2004; 18(2): 128-33.

GROSEN D, CHEVRIER C, SKYTTE A, BILLE C, MOLSTED K, SIVERTSEN A, et al. **A cohort study of recurrence patterns among more than 54,000 relatives of oral cleft cases in Denmark: support for the multifactorial threshold model of inheritance.** Journal Medicine Genetic. 2010; 47(3): 162-8.

GUNDLACH, K. K.; MAUS, C. **Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world-wide** Journal of cranio-maxillo-facial surgery. v. 34, s.n., Scotland, Set/2006 p. 1-2.

HE, M.; BIAN, Z. **Lack of Association between Missense Variants in *GRHL3* (rs2486668 and rs545809) and Susceptibility to Non-Syndromic Orofacial Clefts in a Han Chinese Population.** Public Library of Science one PLoS, v. 11, n. 7, United States of America, 2016.

HONEIN MA, RASMUSSEN SA, REEFHUIS J, ROMITTI PA, LAMMER EJ, SUN L, et al. **Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts.** Epidemiology. 2007; 18(2): 226-33.

HOVORAKOVA M, LESOT H, PETERKA M, PETERKOVA R. **Early development of the human dentition revisited.** Journal of Anatomy. 2018 Aug;233(2):135-145.

JIA, ZL, SHI B, CHEN CH, SHY JY, WU J, XU X. **Maternal malnutrition, environmental expousure during pregnancy and the risk of non – syndromic orofacial clefts.** Oral Disease. 2011

JIANYAN L, ZEQIANG G, YONGJUAN C, KAIHONG D, BING D, RONGSHENG L. **Analysis of interactions between genetic variants of BMP4 and environmental factors with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate susceptibility.** Int J Oral Maxillofacial Surgery. 2010; 39(1): 50-6.

JONES MC. **Etiology of facial clefts: prospective evaluation of 428 patients.** Cleft Palate Journal 1988; 25(1): 16-20.

JUGESSUR A, SHI M, GJESSING HK, LIE RT, WILCOX AJ, WEINBERG CR, et al. **Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia.** PLoS One. 2009; 4(4): e5385.

JUGESSUR A, SKARE O, LIE RT, WILCOX AJ, CHRISTENSEN K, CHRISTIANSEN L, et al. **Xlinked genes and risk of orofacial clefts: evidence from two population-basedstudies in Scandinavia.** PLoS One. 2012; 7(6): e39240.

JUGESSUR, A.; MURRAY, J. C. **Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. Current opinion in genetics and development.** v. 15, n. 3, , England, Jun/2005 p. 270-8.

KELLY, D.; O'DOWLD, T.; REULBACH, U. **Use of folic acid supplements and risk of cleft lip and palate in infants: a population-based cohort study.** British Journal of General Practice. England, Jul/2012.

KHANDELWAL, K.D.; VAN BOKHOVEN, H.; ROSCIOLI, T. *et al.* **Genomic approaches for studying craniofacial disorders.** American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics..v. 163C, n. 4, p. 218–231, 2013.

KUCHLER EC, SABOIA TM, VIEIRA TC, LIPS A, TANNURE PN, DEELEY K, et al. **Studies of genes involved in craniofacial development and tumorigenesis: FGF3 contributes to isolated oral clefts and may interact with PAX9.** Acta Odontol Scand. 2014; 72(8): 1070-8.

KUDRYAVTSEVA, E. I.; SUGIHARA, T. M.; WANG, N. *et al.* **Identification and characterization of Grainyhead-like epithelial trans activator (GET-1), a novel mammalian Grainyhead-like factor.** Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.. v. 226, s.n., p. 604–617, 2003.

- KUMMET CM, MORENO LM, WILCOX AJ, ROMITTI PA, DEROO LA, MUNGER RG, LIE RT, WEHBY GL. **Passive Smoke Exposure as a Risk Factor for Oral clefts- A Large International Population-Based Study.** American Journal of Epidemiology. 2016 May 1;183(9):834-41.
- LEITE, I. C.; KOIFMAN, S. **Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil.** Brazilian oral research., v. 23, n. 1 p. 31-7, Brazil, Jan-Mar/2009.
- LENNON, C. J.; BIRKELAND, A. C.; NUNEZ, J. A. *et al.* **Association of candidate genes with nonsyndromic clefts in Honduran and Colombian populations.** Laryngoscope. v. 122, n. 9, p. 2082-87, 2012.
- LESLIE EJ, LIU H, CARLSON JC, SHAFFER JR, FEINGOLD E, WEHBY G, *ET AL.* **A Genome-wide Association Study of Nonsyndromic Cleft Palate Identifies an Etiologic Missense Variant in *GRHL3*.** American Journal of Human Genetic. 2016;98(4):744-54.
- LESLIE EJ, MARAZITA ML. **Genetics of cleft lip and cleft palate.** American Journal of Medical Genetics. 2014; 163c(4): 246-58.
- LESLIE, E. J.; MARAZITA, M. L. **Genetics of cleft lip and cleft palate. American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics** v. 163, n. 4, p. 246-58, United States of America, Nov/2014.
- LESLIE, E. J.; MURRAY, J. C. **Evaluating rare coding variants as contributing causes to nonsyndromic cleft lip and palate.** Dysmorphology and clinical genetics. v. 84, n. 5, p. 496-500, 2013.
- LIMA LS, RIBEIRO GS, DE AQUINO SN, VOLPE FM, MARTELLI DR, SWERTS MS, *et al.* **Prevalence of depressive symptoms in patients with cleft lip and palate.** Brazilian Journal of Otorhinolaryngology 2015 Mar-Apr;81(2):177-83
- LITTLE J, CARDY A, MUNGER RG. **Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis .**Bull World Health Organ. 2004; 82(3): 213-8.
- LOFFREDO LDE C, DE SOUZA JM, YUNES J, FREITAS JA, SPIRI WC. **[Cleft lip and palate: case-control study].** Revista Saude Publica. 1994; 28(3): 213-7.
- LOPEZ-CAMELO JS, CASTILLA EE, ORIOLI IM. **Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries.** American Journal of Medicine Genetic A. 2010; 152a(10): 2444-58.
- LORENTE C, CORDIER S, BERGERET A, DE WALLE HE, GOUJARD J, AYME S, KNILL - JONES R, CALZOLARI E, BIANCHI F. **Maternal occupational risk factors for oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group.** Scand Scandinavian journal of work, environment & health. 2000
- LUDWIG, K. U.; MANGOLD, E.; HERMS, S. *et al.* **Genome wide meta analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci.** Nature genetics.. n. 44: p. 968-71, 2012.
- MACE, K.A., PEARSON, J.C., MCGINNIS, W. **An epidermal barrier wound repair pathway in *Drosophila* is mediated by grainy head.** Science.v. 308, s.n. p. 381–385, 2005.
- MACHADO RA, MESSETTI AC, DE AQUINO SN, MARTELLI-JÚNIOR H, SWERTS MS, DE ALMEIDA REIS SR, MOREIRA HS, PERSUHN DC, COLETTA RD. **Association Between Genes Involved in Craniofacial Development and**

Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate in the Brazilian Population. Cleft Palate Craniofac J. 2016 Sep;53(5):550-6

MANGOLD E, LUDWIG KU, NOTHEN MM. **Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting.** Trends Mol Med. 2011; 17(12): 725-33

MANGOLD, E.; LUDWIG, K. U.; NÖTHEN, M. M. **Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting.** Trends in molecular medicine. v. 12, n. 12, p. 725-33, England, 2016.

MARAZITA ML, FIELD LL, COOPER ME, TOBIAS R, MAHER BS, PEANCHITLERTKAJORN S, *et al.* **Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families.** American Journal of Human Genetics. 2002; 71(2): 349-64.

MARAZITA ML, LIDRAL AC, MURRAY JC, FIELD LL, MAHER BS, GOLDSTEIN MCHENRY T, *et al.* **Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results.** Human Hered. 2009; 68(3): 151-70

MARAZITA ML, MOONEY MP. **Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate.** Clinical Plastic Surgery. 2004; 31(2): 125-40.

MARTELLI DR, MACHADO RA, SWERTS MS, RODRIGUES LA, AQUINO SN, MARTELLI JUNIOR H. **Non syndromic cleft lip and palate: relationship between sex and clinical extension.** Brazilian Journal of Otorhinolaryngology. 2012; 78(5): 116-20.

MARTELLI-JUNIOR H, PORTO LV, MARTELLI DR, BONAN PR, FREITAS AB, DELLA COLETTA R. **Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005.** Braz Oral Res. 2007; 21(4): 314-7.

MATTHEWS JL, ODDONE-PAOLUCCI E, HARROP RA. **The Epidemiology of Cleft Lip and Palate in Canada, 1998 to 2007.** Cleft Palate Craniofacial Journal. 2015; 52(1).

MEYER KA, WERLER MM, HAYES C, MITCHELL AA. **Low maternal alcohol consumption during pregnancy and oral clefts in offspring: the Slone Birth Defects Study.** Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2003; 67(7): 509-14

MONTAGNOLI LC, BARBIERI MA, BETTIOL H, MARQUES IL, DE SOUZA L. **Growth impairment of children with different types of lip and palate clefts in the first years of life: a cross-sectional study.** Journal of Pediatrics (Rio J). 2005; 81(6): 461-5.

MOSSEY PA, LITTLE J, MUNGER RG, DIXON MJ, SHAW WC. **Cleft lip and palate.** Lancet. 2009; 374(9703): 1773-85.

MARAZITA, M. L. **Subclinical features in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (CL/P): review of the evidence that subepithelial orbicularis oris muscle defects are part of an expanded phenotype for CL/P.** Orthodontics and craniofacial research v. 10, s.n. p. 82-87, 2007.

MARAZITA, M. L.; LIDRAL, A. C.; MURRAY, J. C. *et al.* **Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype specific differences in linkage and association results.** Human Heredity. v. 68 n. 3 p. 151-70, Switzerland, 2012.

- MARAZITA, M. L.; NEISWANGER, K. **Association studies. In: Wyszynski DFE ,ed. Cleft lip and palate: from origin to treatment.** Oxford University Press.p. 240–254, United States, 2002.
- MARTELLI, D. R. B.; BONAN, P. R.; SOARES, M. C. *et al.* **Analysis of familial incidence of non-syndromic cleft lip and palate in a Brazilian population.** Medicina oral, patología oral y cirugía bucal.. v. 15, n. 6, p. 898-01, Spain, 2010.
- MARTELLI-JÚNIOR, H. FILÉZIO, M. R.; PINTO, E. B.; AQUINO, S. N.; **Polymorphisms in and Oral Clefting in the Brazilian Population.** DNA and cell biology.. v. 32, n. 3, p. 125-29, 2013.
- MOSSEY, P. A.; LITTLE, J.; MUNGER, R. G., *et al.* Cleft lip and palate .Lancet, v. 374, n. 9703, p. 1773–1785, England, 2009.
- MURTHY J, BHASKAR L. **Current concepts in genetics of nonsyndromic clefts.** Indian Journal of Plastic Surgery. 2009; 42(1): 68-81.
- NARASIMHA, M., UV, A., KREJCI, A., BROWN, N.H. *et al.* **Grainy head promotes expression of septate junction proteins and influences epithelial morphogenesis.** Journal of cellular biology and molecular sciences. v. 121, p. 747–752, 2008.
- NATSUME N, KAWAI T, KOHAMA G, TESHIMA T, KOCHI S, OHASHI Y, *et al.* **Incidence of cleft lip or palate in 303738 Japanese babies born between 1994 and 1995.** Brazilian Journal Oral Maxillofacial Surgery. 2000; 38(6): 605-7.
- NEISWANGER, K.; DELEYIANNIS, F. W.; AVILA, J. R. *et al.* **Candidate genes for oral-facial clefts in Guatemalan families.** Annals of plastic surgery. v. 56, n. 5, p. 518-521, 2006.
- NOPOULOS P, LANGBEHN DR, CANADY J, MAGNOTTA V, RICHMAN L. **Abnormal brainstructure in children with isolated clefts of the lip or palate.** Arch Pediatr Adolesc Med. 2007; 161(8): 753-8.
- OSTROWSKI, S.; DIERICK, H.A.; BEJSOVEC, A. **Genetic control of cuticle formation during embryonic development of Drosophila melanogaster.** Genetics v. 161, s.n. p. 171–182, 2002.
- PAN, Y.; ZHANG, W.; DU, Y.; TONG, N. *et al.* **Different roles of two novel susceptibility loci for nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population .** American journal of medical genetics. Part A v. 155, n. 9, p. 2180-85, 2011.
- PARANAIBA LM, AQUINO SN, BUFALINO A, MARTELLI-JUNIOR H, GRANER E, BRITO LA, *et al.* **Contribution of polymorphisms in genes associated with craniofacial development to the risk of nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population.** Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2013; 18(3): e414-20.
- PATEL PJ, BEATY TH, RUCZINSKI I, MURRAY JC, MARAZITA ML, MUNGER RG, *et al.* **Xlinked markers in the Duchenne muscular dystrophy gene associated with oral clefts.** Euro Journal Oral Science 2013; 121(2): 63-8.
- PENA SD, DI PIETRO G, FUCHSHUBER-MORAES M, GENRO JP, HUTZ MH, KEHDY FDES, *et al.* **The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected.** PLoS One. 2011; 6(2): e17063.
- RAHIMOV F, JUGESSUR A, MURRAY JC. **Genetics of nonsyndromic orofacial clefts.** Craniofacial Journal. 2012; 49(1): 73-91.

PEYRARD-JANVID, M.; LESLIE, E.J.; KOUSA, Y.A. *et al.* **Dominant mutations in *GRHL3* cause Van der Woude Syndrome and disrupt oral periderm development.** American journal of medical genetics. Part A. v. 94, n. 1, p. 23–32, 2014.

PRESCOTT, N. J.; MALCOLM, S. **Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development.** The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association. v. 39, n. 3, p. 327-31, 2002.

RAHIMOV, F.; JUGESSUR, A.; MURRAY, J. C. **Genetics of nonsyndromic orofacial clefts** *The Cleft palate-craniofacial journal* : Official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association. v. 49, n. 1, p. 73-91 United States, 2012.

RAY JG, MEIER C, VERMEULEN MJ, WYATT PR, COLE DE. **Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts.** Journal Pediatrics. 2003; 143(6): 805-7.

RODRIGUES K, SENA MF, RONCALLI AG, FERREIRA MA. **Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil.** Brazilian Oral Research. 2009;23(1):38-42.

RODRIGUES K, SENA MF, RONCALLI AG, FERREIRA MA. **Prevalence of orofacial clefts and social factors in brazil.** Brazilian Oral Research. 2009; 23(1): 38-

ROMITTI PA, HERRING AM, DENNIS LK, WONG-GIBBONS DL. **Meta-analysis: pesticides and orofacial clefts** Craniofacial Journal. 2007; 44(4): 358-65.

ROMITTI PA, LIDRAL AC, MUNGER RG, DAACK-HIRSCH S, BURNS TL, MURRAY JC. **Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts.** Teratology. 1999; 59(1): 39-50

ROMITTI PA, SUN L, HONEIN MA, REEFHUIS J, CORREA A, RASMUSSEN SA. **Maternal periconceptional alcohol consumption and risk of orofacial clefts.** American Journal of Epidemiology. 2007b; 166(7): 775-85.

SHKOUKANI MA, CHEN M, VONG A. **Cleft lip - a comprehensive review.** Front Pediatr. 2013; 1: 53.

SIVERTSEN A, WILCOX AJ, SKJAERVEN R, VINDENES HA, ABYHOLM F, HARVILLE E, *et al.* **Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives.** Bmj. 2008; 336(7641): 432-4

SPINA V, PSILLAKIS JM, LAPA FS, FERREIRA MC. **[Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes].** Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 1972 Jan-Feb;27

SPINDER N, BERGMAN JEH, BOEZEN HM, VERMEULEN RCH, KROMHOUT H, DE WALLE HEK. **Maternal occupational exposure and oral clefts in offspring.** Environmental Health. 2017 Aug 4;16(1):83.

STUPPIA L, CAPOGRECO M, MARZO G, LA ROVERE D, ANTONUCCI I, GATTA V, *et al.* **Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate.** Journal of Craniofacial Surgery 2011;22(5):1722-6.

SUHL J., ROMITTI P. , ROCHELEAU C., et al. **Parental occupational pesticide exposure and nonsyndromic orofacial clefts**, Journal of Occupational and Environmental hygiene 2018

TAIOLI E, RAGIN C, ROBERTSON L, LINKOV F, THURMAN NE, VIEIRA AR. **Cleft lip and palate in family members of cancer survivors**. Cancer Invest. 2010; 28(9): 958-62.

VAN DEN BOOGAARD MJ, DE COSTA D, KRAPELS IP, LIU F, VAN DUIJN C, SINKE RJ, et al. **The MSX1 allele 4 homozygous child exposed to smoking at periconception is most sensitive in developing nonsyndromic orofacial clefts**. Human Genetics. 2008;124(5): 525-34

VIEIRA AR, ORIOLI IM. **Birth order and oral clefts: a meta analysis**. Teratology. 2002;66(5):209-16.

VIEIRA AR. **Unraveling human cleft lip and palate research**. Journal of Dentistry Research. 2008;87(2): 119-25

WANG M, WANG ZP, GONG R, ZHAO ZT. **Maternal smoking during pregnancy and neural tube defects in offspring: a meta-analysis**. Childs Nerv Syst. 2014; 30(1): 83-9.

WANG Y, SUN Y, HUANG Y, PAN Y, JIA Z, MA L, *ET AL*. **Association study between Van der Woude Syndrome causative gene *GRHL3* and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chinese cohort**. Gene. 2016;588(1):69-73.

WEHBY GL, CASSELL CH. **The impact of orofacial clefts on quality of life and healthcare use and costs**. Oral Disease. 2010; 16(1): 3-10

WEHBY GL, CASTILLA EE, GOCO N, RITTLER M, COSENTINO V, JAVOIS L, et al. **The effect of systematic pediatric care on neonatal mortality and hospitalizations of infants born with oral clefts**. BMC Pediatrics. 2011; 11: 121.

WEHBY GL, MURRAY JC. **Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence**. Oral Disease. 2010; 16(1): 11-9.

WEINBERG SM, PARSONS TE, FOGEL MR, WALTER CP, CONRAD AL, NOPOULOS **Corpus callosum shape is altered in individuals with nonsyndromic cleft lip and palate**. American Journal of Genetic . 2013; 161a(5): 1002-7.

WEINBERG, S. M.; NEISWANGER, K.; MARTIN, R. *et al*. **The Pittsburgh Oral-Facial Cleft study: expanding the cleft phenotype. Background and justification**. The Cleft palate-craniofacial Journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association. v. 43, s.n. p. 7–20, 2006.

WU D, WANG M, WANG X, YIN N, SONG T, LI H, et al. **Maternal transmission effect of a PDGF-C SNP on nonsyndromic cleft lip with or without palate from a Chinese population**. PLoS One. 2012; 7(9): e46477.

WYSZYNSKI DF, DUFFY DL, BEATY TH. **Maternal cigarette smoking and oral clefts: a meta-analysis**. Cleft Palate Craniofacial Journal. 1997; 34(3): 206-10

YANG W, CARMICHAEL SL, ROBERTS EM, KEGLEY SE, PADULA AM, ENGLISH PB, ET AL **Residential agricultural pesticide exposures and risk of neural tube defects and orofacial clefts among offspring in the San Joaquin Valley of California**. American Journal of Epidemiology. 2014; 179(6): 740-8

YU Z, CHEN J, FORD BN, BRACKLEY ME, GLICKMAN BW. **Human DNA repair systems: an overview.** Environ Mol Mutagen. 2000; 33(1): 3-20.

ZEIGER, J. S.; BEATY, T. H. **Is there a relationship between risk factors for oral clefts?** Teratology. v. 66, n. 5, p. 205-208, 2002.

ZHANG B, JIAO X, MAO L, XUE J. **Maternal cigarette smoking and the associated risk of having a child with orofacial clefts in China: a case-control study.** Journal of Craniomaxillofacial Surgery. 2011; 39(5): 313-8.

ZHOU B, SHAN H, SU Y, XIA K, SHAO X, MAO W, et al. **The association of APE1 -656T > G and 1349 T > G polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 37 case-control studies.** BMC Cancer. 2011; 11: 521.

ZUCCHERO, T. *et al.* **Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate.** The New England journal of medicine.. v. 351, n. 8, p. 769-80, England, 2004.

Anexo 1

UNIOESTE - CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GRHL3 NA FISSURA LÁBIOPALATAL NÃO-SINDRÔMICA

Pesquisador: ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 60943716.6.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ

Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.087.154

Apresentação do Projeto:

O Projeto intitulado "AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GRHL3 NA FISSURA LÁBIOPALATAL NÃO-SINDRÔMICA" é apresentado pela docente Ana Lúcia Rangel, como projeto de mestrado de sua orientada Camilla de Marchi Sanches Azevedo.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto apresenta como **Objetivo Primário:** Este projeto tem como objetivo investigar a relação de fatores de risco com o desenvolvimento de fissuras labiopalatais não-sindrômicas em uma amostra da cidade de Cascavel, PR.

Objetivo Secundário: - Descrever as características clínicas, demográficas e de risco de um grupo de indivíduos com FL/PNS da cidade de Cascavel - Paraná. - Determinar a possível associação de polimorfismos contidos no gene GRHL3 com a suscetibilidade para o desenvolvimento de FL/PNS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto apresenta como potenciais **Riscos:** Há o risco de não preservar a privacidade dos dados dos sujeitos da pesquisa. Embora os riscos sejam minimizados, visto que os pesquisadores

Endereço: UNIVERSITÁRIA

Bairro: UNIVERSITARIO

UF: PR

Telefone: (45)3230-3272

Município: CASCAVEL

CEP: 85.819-110

E-mail: cep.prcpq@unioeste.br

UNIOESTE - CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 1267.194

responsáveis aqui assinam um termo de compromisso para uso de dados de arquivo e todos os cuidados são realizados neste sentido. Além disso, há o risco de haver alguma intercorrência com o sujeito durante a execução da pesquisa, e caso isso ocorra, os cuidados serão prestados pelos pesquisadores responsáveis ou SAMU será acionado.

Benefícios: Se comprovada a associação positiva do gene candidato GRHL3 em casos de fissuras não síndrômicas, poderá ser decisiva a contribuição futura quanto ao aconselhamento genético da população.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante e bem apresentada, com viabilidade de execução

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados

Recomendações:

Recomenda-se aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_805989.pdf	11/05/2017 16:31:01		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cep_unicamp.pdf	11/05/2017 16:30:22	ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	justificativa.pdf	11/05/2017 10:06:26	ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cep_apoflab.pdf	11/05/2017 09:56:04	ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL	Aceito
Outros	termo_uso_dados_arquivo.pdf	11/05/2017 09:55:46	ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_coleta_nao_iniciada.pdf	11/05/2017 09:55:01	ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL	Aceito

Endereço: UNIVERSITARIA
Bairro: UNIVERSITARIO CEP: 85.815-110
UF: PR Município: CASCAVEL E-mail: cep.prcpp@unioeste.br
Telefone: (41)3220-3272

UNIOESTE - CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 3287-154

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Tcle.pdf	11/05/2017 09:54:31	ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL	Acerto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_plataforma_brasil.pdf	11/05/2017 09:54:15	ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL	Acerto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cep_unioeste.pdf	11/05/2017 09:54:00	ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL	Acerto
Folha de Rosto	folha_da_rosto.pdf	06/10/2016 16:18:10	ANA LUCIA CARRINHO AYROZA RANGEL	Acerto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CASCADEL, 29 de Maio de 2017

Assinado por:

Fausto José da Fonseca Zamboni
(Coordenador)

Endereço: UNIVERSITÁRIA

Bairro: UNIVERSITÁRIO

CEP: 85.819-110

UF: PR

Município: CASCADEL

Telefone: (45)3220-3272

E-mail: cep.prgg@unioeste.br

Anexo 2

Ficha Cadastral para Pacientes com Fissura Oral

Centro: _____

Nº: _____

1. Nome:		
2. Gênero:	1. Masculino <input type="checkbox"/> ; 2. Feminino <input type="checkbox"/> .	
3. Data Nascimento:	____/____/____	() anos.
4. Nacionalidade	4.1 Naturalidade: _____	
5. Zona:	1. Urbana <input type="checkbox"/> ; 2. Rural <input type="checkbox"/> .	
6. Cor da pele:	1. Caucasiano <input type="checkbox"/> ; 2. Ascendência africana <input type="checkbox"/> ; 3. Ascendência japonesa <input type="checkbox"/> ; 4. Ascendência indígena <input type="checkbox"/> ; 5. Outros <input type="checkbox"/> .	
7. Grau de Instrução:	1. Sem Escolaridade <input type="checkbox"/> ; 2. E. Fundamental Incompleto <input type="checkbox"/> ; 3. E. Fundamental Completo <input type="checkbox"/> ; 4. E. Médio Incompleto <input type="checkbox"/> ; 5. E. Médio Completo <input type="checkbox"/> ; 6. E. Superior Incompleto <input type="checkbox"/> ; 7. E. Superior Completo <input type="checkbox"/> ; 8. Não se aplica <input type="checkbox"/> .	
8. Número de irmãos: ()	1. Masculino (); 2. Feminino ().	
9. Data de nascimento materna:	____/____/____ () anos.	
9.1. Data de nascimento paterna:	____/____/____ () anos.	
9.2. Idade na gestação materna:	() anos.	
9.3. Idade na gestação paterna:	() anos.	
9.4. Cor de pele materna:	1. Leucoderma <input type="checkbox"/> ; 2. Feoderma <input type="checkbox"/> ; 3. Xantoderma <input type="checkbox"/> ; 4. Melanoderma <input type="checkbox"/> .	
9.5. Cor de pele paterna:	1. Leucoderma <input type="checkbox"/> ; 2. Feoderma <input type="checkbox"/> ; 3. Xantoderma <input type="checkbox"/> ; 4. Melanoderma <input type="checkbox"/> .	
9.6 Consanguidade:	1. Positiva <input type="checkbox"/> , 2. Negativa <input type="checkbox"/>	
10. Profissão materna:	1. Lavradora <input type="checkbox"/> ; 2. Do lar <input type="checkbox"/> ; 3. Estudante <input type="checkbox"/> ; 4. Autônoma <input type="checkbox"/> ; 5. Não se aplica <input type="checkbox"/> ; 6. Outros <input type="checkbox"/> . Qual? _____.	
10.1. Contato com produto químico?	1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> ; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/> . Qual? _____.	
11. Profissão paterna:	1. Lavrador <input type="checkbox"/> ; 2. Sem ocupação <input type="checkbox"/> ; 3. Estudante <input type="checkbox"/> ; 4. Autônomo <input type="checkbox"/> ; 5. Não se aplica <input type="checkbox"/> ; 6. Outros <input type="checkbox"/> . Qual? _____.	
11.1. Contato com produto químico?	1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> ; Não se aplica <input type="checkbox"/> . Qual? _____.	

12. Ordem de Paridade (incluindo aborto): (* aborto; ** natimorto)	
12.1. 1º Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/> ; 2. Feminino <input type="checkbox"/> ; ____/____/____; () anos.	
12.2. 2º Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/> ; 2. Feminino <input type="checkbox"/> ; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/> . ____/____/____; () anos.	
12.3. 3º Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/> ; 2. Feminino <input type="checkbox"/> ; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/> . ____/____/____; () anos.	
12.4. 4º Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/> ; 2. Feminino <input type="checkbox"/> ; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/> . ____/____/____; () anos.	
12.5. 5º Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/> ; 2. Feminino <input type="checkbox"/> ; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/> . ____/____/____; () anos.	
12.6. 6º Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/> ; 2. Feminino <input type="checkbox"/> ; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/> . ____/____/____; () anos.	
12.7. 7º Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/> ; 2. Feminino <input type="checkbox"/> ; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/> . ____/____/____; () anos.	
12.8. 8º Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/> ; 2. Feminino <input type="checkbox"/> ; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/> . ____/____/____; () anos.	
12.9. N° de filhos: ().	
12.10. Aborto(s): ().	
12.11. Natimorto(s): ().	
13. Renda familiar:	
1. até um salário mínimo (incluso) <input type="checkbox"/> ;	
2. entre um e três salários mínimos (incluso) <input type="checkbox"/> ;	
3. três a cinco salários mínimos (incluso) <input type="checkbox"/> ;	
4. mais de cinco salários mínimos <input type="checkbox"/>	
14. Hábitos maternos na gestação:	14.1. Álcool: 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> . Quantidade: _____; Tempo de utilização: _____. 14.2. Fumo: 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> . Quantidade: _____; Tempo de utilização: _____. 14.3. Drogas: 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> . Qual(is)? _____. Quantidade: _____; Tempo de utilização: _____.
15. Suplementação na gestação: 1. Sem suplementação <input type="checkbox"/> ; 2. Ácido fólico <input type="checkbox"/> ; 3. Outras vitaminas <input type="checkbox"/> ; 4. Não sabe informar <input type="checkbox"/> .	
15.1. Se respondeu outras vitaminas, quais (qual)? _____.	
15.2. Trimestre da gravidez em que usou suplementação: 1. 1º Trimestre <input type="checkbox"/> ; 2. 2º Trimestre <input type="checkbox"/> ; 3. 3º Trimestre <input type="checkbox"/> ; 4. Não se aplica <input type="checkbox"/> .	
15.3 Gestação a termo <input type="checkbox"/> ou não <input type="checkbox"/>	
16. Uso de medicamentos na gestação: 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> .	
16.1. Tipo de medicamento: _____.	
16.2. Trimestre da gravidez? 1. 1º trimestre <input type="checkbox"/> ; 2. 2º trimestre <input type="checkbox"/> ; 3. 3º trimestre <input type="checkbox"/> ; 4. Não se aplica <input type="checkbox"/> .	
16.3. Dosagem utilizada: _____.	
16.4. Tempo de utilização: _____.	
17. Uso de anticoncepcional antes da gestação? 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> .	
17.1. Via de uso: 1. Oral <input type="checkbox"/> ; 2. Injetável <input type="checkbox"/> . 17.2. Tempo de utilização: _____.	

18. Problemas médicos apresentados durante a gestação: 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> .	
18.1. Qual (quais)? 1. Diabetes <input type="checkbox"/> ; 2. Pressão alta <input type="checkbox"/> ; 3. Infecção urinária <input type="checkbox"/> ; 4. Problemas neurológicos <input type="checkbox"/> ; 5. Outro(s) <input type="checkbox"/> . Qual (quais)? _____. 6. Não se aplica <input type="checkbox"/> .	
19. Histórico de obesidade materna: 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> .	
19.1. Antes do filho fissurado: 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> ; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/> .	
19.2. Depois do filho fissurado: 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> ; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/> .	
19.3. Quantos quilos (máximo)? _____. 19.4. Altura materna: _____.	
19.5. Peso da criança ao nascimento: _____. 19.6. Comprimento ao nascimento: _____.	
20. Tem histórico de câncer na família? 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> ; 3. Não sabe informar <input type="checkbox"/> .	
20.1. Qual tipo? _____.	
20.2. Grau de parentesco: _____.	
21. Tipo da fissura do paciente:	
1. FP (isolada) completa <input type="checkbox"/> ; 2. FP (isolada) incompleta <input type="checkbox"/> ;	
3. FL (isolada) completa unilateral <input type="checkbox"/> ; 4. FL (isolada) completa bilateral <input type="checkbox"/> ; 5. FL (isolada) incompleta unilateral <input type="checkbox"/> ;	
6. FL incompleta bilateral <input type="checkbox"/> ;	
7. FLP completa unilateral esquerda <input type="checkbox"/> ; 8. FLP completa unilateral direita <input type="checkbox"/> ; 9. FLP bilateral incompleta <input type="checkbox"/> ;	
10. FLP bilateral completa <input type="checkbox"/> ; 11. Fissuras raras (outras) <input type="checkbox"/> : _____	
22. Histórico familiar de fissurados: 1. Positivo <input type="checkbox"/> ; 2. Negativo <input type="checkbox"/> .	
22.1. Grau de parentesco: _____.	
22.2. Tipo de fissura:	
1. FP (isolada) completa <input type="checkbox"/> ; 2. FP (isolada) incompleta <input type="checkbox"/> ;	
3. FL (isolada) completa unilateral <input type="checkbox"/> ; 4. FL (isolada) completa bilateral <input type="checkbox"/> ; 5. FL (isolada) incompleta unilateral <input type="checkbox"/> ;	
6. F bilateral incompleta; 7. F bilateral completa <input type="checkbox"/> ;	
8. FLP completa unilateral esquerda <input type="checkbox"/> ; 9. FLP completa unilateral direita <input type="checkbox"/> ; 10. FLP bilateral incompleta <input type="checkbox"/> ;	
11. FLP bilateral completa <input type="checkbox"/> ; 12. Fissuras raras (outras) <input type="checkbox"/> : _____ 13. Não se aplica <input type="checkbox"/> .	
23. Primeiro atendimento:	
1. Centrinho <input type="checkbox"/> ; 2. Outra localidade <input type="checkbox"/> . Onde? _____.	
24. Já foi submetido a procedimento cirúrgico? 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> .	
24.1. Primeira cirurgia foi com que idade (anos)? (). Qtas cirurgias realizadas? _____.	
24.3. Região(s) anatômica(s) da(s) cirurgia(s) _____.	
25. Cirurgia Plástica no Centrinho: 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> .	
25.1. Tipo de cirurgia:	
1.1 Queiloplastia Millard 1 <input type="checkbox"/> ; 1.2. Queiloplastia Spina <input type="checkbox"/> ; 1.3. Queiloplastia <input type="checkbox"/> ;	
2.1. Palatoplastia VonLangenback <input type="checkbox"/> ; 2.2. Palatoplastia Veau <input type="checkbox"/> ; 2.3. Palatoplastia Furlow <input type="checkbox"/> ; 2.4. Palatoplastia <input type="checkbox"/> ;	
3.1. Rinoplastia McCoomb <input type="checkbox"/> ; 3.2 Rinoplastia Diógenes <input type="checkbox"/> ; 3.3 Rinoplastia <input type="checkbox"/> .	

