



HELENARA SALVATI BERTOLOSSI MOREIRA

**“AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM
GENES DO REPARO DO DNA NA FISSURA LÁBIO-PALATINA NÃO
SINDRÔMICA”**

PIRACICABA

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

HELENARA SALVATI BERTOLOSSI MOREIRA

**“AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM
GENES DO REPARO DO DNA NA FISSURA LÁBIO-PALATINA NÃO
SINDRÔMICA”**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutora em Estomatopatologia, na Área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Helenara Salvati Bertolossi Moreira e orientada pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Assinatura do orientador

PIRACICABA

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Josidelma Francisca Costa de Souza - CRB 8/5894

M813a Moreira, Helenara Salvati Bertolossi, 1972-
Avaliação epidemiológica e investigação de polimorfismos em genes do reparo do DNA na fissura lábio-palatina não sindrômica / Helenara Salvati Bertolossi Moreira. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Ricardo Della Coletta.
Coorientador: Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Polimorfismo genético. 2. Fatores de risco. 3. Fenda labial. 4. Estudos epidemiológicos. I. Coletta, Ricardo Della, 1972-. II. Rangel, Ana Lúcia Carrinho Ayroza. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Epidemiologic evaluation and investigation of polymorphisms in DNA repair genes in syndromic cleft lip-palate

Palavras-chave em inglês:

Genetic Polymorphism

Risk factors

Cleft lip

Epidemiologic studies

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutora em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Ricardo Della Coletta [Orientador]

Andréa Bufalino

Edgar Graner

Hercílio Martelli Júnior

Sílvia Reis

Data de defesa: 10-10-2014

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 10 de Outubro de 2014, considerou a candidata HELENARA SALVATI BERTOLOSSI MOREIRA aprovada.

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

Profa. Dra. ANDREIA BUFALINO

Profa. Dra. SILVIA REGINA DE ALMEIDA REIS

Prof. Dr. EDGARD GRANER

Prof. Dr. HERCILIO MARTELLI JUNIOR

RESUMO

As fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas (FL/PNS) representam as malformações faciais mais comuns em seres humanos e são causadas por uma combinação de fatores genéticos e ambientais sob um modelo de herança multifatorial. O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil epidemiológico (características clínicas, demográficas e ambientais) dos indivíduos afetados por FL/PNS residentes na região oeste do estado do Paraná na busca por fatores de risco para o desenvolvimento das FL/PNS e também verificar a associação de polimorfismos em genes que codificam enzimas do sistema do reparo do DNA na susceptibilidade das FL/PNS. Para a primeira parte do estudo, foram coletadas 194 amostras de saliva de pacientes com FL/PNS e seus pais, sendo que os mesmos foram entrevistados com um questionário, contendo perguntas relacionadas aos pacientes com fissura e aos seus genitores, visando levantar dados referentes aos aspectos ambientais relacionados às fissuras. A segunda parte do estudo envolveu a análise dos polimorfismos rs1136410 no gene *ADPRT*, rs1052133 no gene *OGG1*, rs1800734 no gene *MLH1*, rs1130409 no gene *APEX1*, rs861539 no gene *XRCC3*, rs1801321 no gene *RAD51*, rs25487, rs25489, rs3213245 e rs1799782 no gene *XRCC1* e rs13181 e rs1799793 no gene *ERCC2* em 223 trios (pai, mãe e paciente com fissura) pelo teste de desequilíbrio de transmissão (TDT). As amostras utilizadas para a investigação de polimorfismo foram provenientes de 4 Centros diferentes de tratamento da FL/P, composta por 93 trios de Minas Gerais, 74 do Paraná, 34 da Bahia e 22 da Paraíba. Entre os pacientes avaliados, um predomínio de homens, leucodermas e afetados por fissuras lábio-palatinas (FLP) foi observado. Entre as alterações sistêmicas, as otorrinolaringológicas foram significativamente mais prevalentes em fissuras palatinas (FP) em comparação com as fissuras labiais (FL; $p=0,013$). Mais de 80% das mães dos pacientes com FL/PNS reportaram que não fizeram uso de suplementos vitamínicos durante o primeiro trimestre de gestação. Entre os 12 polimorfismos avaliados, rs3213245 no gene *XRCC1* demonstrou uma significativa associação com FL ($p=0,03$) e rs13181 do gene *ERCC2* demonstrou tendência de associação com FLP ($p=0,06$). O haplótipo formado pelos polimorfismos rs25487,

rs25489, rs321345 e rs1799782 no gene *XRCC1* também foi significativamente associado as FLs ($p=0,02$). Os resultados deste estudo revelaram o perfil epidemiológico dos pacientes com FL/PNS atendidos no oeste do estado do Paraná e demonstram que os polimorfismos nos genes *XRCC1* e *ERCC2*, que codificam enzimas associadas ao sistema e reparo do DNA, podem estar associados à suscetibilidade ao desenvolvimento das FL/PNS.

Palavras chaves: fissura lábio-palatina não síndrômica, perfil epidemiológico, fatores de risco, genes do reparo do DNA, polimorfismo genético.

ABSTRACT

Nonsyndromic cleft lip and palate (NSCL/P) represents the most common facial malformation in humans, and they are caused by a combination of genetic and environmental factors under a multifactorial model of inheritance. The objective of this study was to characterize the epidemiologic profile (clinical, demographical and environmental features) of individuals affected by the NSCL/P in the west of the Paraná state searching for risk factors for the development of NSCL/P, and to verify the association of polymorphisms in genes that encode enzymes of the DNA repair system in the susceptibility of the NSCL/P. For the first part of the study, 194 patients with NSCL/P and their parents were interviewed with a questionnaire containing questions associated with the patients with cleft and their parents, addressing points of environmental aspects related to the clefts only in the western of the city of Parana. The genetic study involved the analysis of the polymorphisms rs1136410 in the gene *ADPRT*, rs1052133 in the gene *OGG1*, rs1800734 in the gene *MLH1*, rs1130409 in the gene *APEX1*, rs861539 in the gene *XRCC3*, rs1801321 in the gene *RAD51*, rs25487, rs25489, rs3213245 and rs1799782 in the gene *XRCC1* and rs13181 and rs1799793 in the gene *ERCC2* in 223 trios (father, mother and the patient with cleft) by the disequilibrium of transmission test (TDT). The sample to the investigation of the polymorphism were from four centers of FL/PNS treatment, composed by 93 trio from Minas Gerais, 74 from Parana, 34 from Bahia and 22 from Paraiba. A predominance of men, leucoderma and affected by cleft lip and palate (CLP) was observed. In relation to systemic alterations, the otorhinolaryngologies were significantly more prevalent in in patients with cleft palate clefts (CP) in comparison with patients affected by cleft lip (CL, $p=0.013$). More than 80% of the mothers of the NSCL/P patients reported that they did not use vitamin supplements during their first trimester of the pregnancy. Among the 12 polymorphisms, rs3213245 in *XRCC1* demonstrated a significant association with the CL ($p=0.03$) and rs13181 in *ERCC2* demonstrated atendency of association with CLP ($p=0.06$). The haplotype formed by *XRCC1* polymorphisms rs25487, rs25489, rs321345 and rs1799782 1 was significantly associated with CL ($p=0.02$). The results of this study show the epidemiologic

profile of the patients with NSCL/P assisted in the west of Parana state and demonstrated that polymorphisms in the genes *XRCC1* and *ERCC2*, which encode enzymes of the DNA repair system, may be associated with the susceptibility of the NSCL/P development.

Keywords: Nonsyndromic cleft lip and palate, epidemiologic profile, risk factors, DNA repair genes, genetic polymorphism.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3. PROPOSIÇÃO.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
5. RESULTADOS.....	51
6. DISCUSSÃO.....	73
7. CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXOS.....	131

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pois só Ele merece toda a honra toda a glória e todo o louvor. Se não fosse por Ele teria sido impossível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela sua fidelidade, pois Ele permitiu que esse doutorado fosse possível na minha vida, bem como a conclusão deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Professor Doutor Jacks Jorge Júnior.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, na pessoa do reitor Paulo Sergio Wolff, diretor de campus Alexandre Almeida Webber, diretora de centro Joseane Rodrigues da Silva Nobre, coordenador de colegiado Eduardo Tanaka de Castro, que em conjunto com a Universidade Estadual de Campinas viabilizaram a execução deste programa de doutorado.

Ao Professor Doutor Ricardo Della Coletta e Professora Doutora Ana Lucia Carrinho Ayroza Rangel pela iniciativa e o empenho de nos possibilitar o doutorado interinstitucional FOP/UNICAMP e UNIOESTE.

Ao Professor Doutor Alan Roger dos Santos Silva, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

A banca examinadora da qualificação Profa. Dra. Carine Ervolino de Oliveira, Profa. Dra. Nilva de Karla Cervigne e Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques pelas sugestões que auxiliaram no aprimoramento deste estudo. A banca examinadora da defesa Profa. Dra. Andréa Bufalino, Prof. Dr. Edgar Graner; Prof. Dr. Herícilio Martelli Júnior, Profa. Dra. Siliva Reis. Obrigada por aceitarem prontamente o nosso convite e pelo tempo dedicado a leitura e as sugestões.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Della Coletta que, aceitou orientar meu trabalho mesmo eu não sendo da sua área. Obrigada pela confiança e aprendizado. Sua dedicação, paciência, prontidão e excelência no que faz são características marcantes na sua forma de orientar.

À Professora Doutora Ana Lucia Carrinho Ayroza Rangel pela dedicação e empenho em trazer o DINTER para a Unioeste e pela ajuda prestada em todo o tempo.

Aos Professores Doutores do Departamento de Diagnóstico Oral, áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Ricardo Della Coletta, Alan Roger dos Santos Silva, Jacks Jorge Júnior, Pablo Vargas, Marcio Ajudarte Lopes, Edgard Graner e Oslei Paes de Almeida. Obrigada pelos ensinamentos repassados durante a realização dos créditos.

A coordenadora do comitê de ética da FOP Livia Maria Andaló Tenuta pelo auxílio prestado durante todo o longo processo de submissão do trabalho ao comitê pela sua disposição e auxílio e responsabilidade.

Aos novos amigos da FOP, Sibeles Nascimento de Aquino e Renato Assis Machado do Laboratório de Biologia Molecular que me ensinaram o procedimento de extração e análise do DNA. Sem vocês dois este trabalho não teria sido possível. Vocês demonstraram muita paciência afeto e companheirismo. Não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês fizeram por mim. Aos outros alunos do laboratório que sempre me receberam muito bem durante as várias visitas na FOP.

A APOFILAB, um exemplo de instituição na humanização, acolhimento e no atendimento aos pacientes. Agradecimento especial a diretoria, a Sônia Maria Jimenez Phrun, a equipe pedagógica pelo auxílio no fornecimento dos horários dos alunos, a equipe da recepção e a Angélica Mito Canassa e Claudine Oldoni,

a todas as professoras que sempre me auxiliaram com os pacientes, especialmente a Mari Lucia Pavela, a psicóloga Luciana Zordan, a toda a equipe de apoio e a equipe da odonto representada pela ajuda da Maria Elisa Capelari.

Ao CEAPAC pela possibilidade de abrir as portas para a coleta de dados. Em especial a Tânia que sempre demonstrou atendimento humanizado e a enfermeira Fabiana Mattos. Obrigada ao banco de leite representado pela enfermeira Ane Elise pelo armazenamento das amostras. A professora Dra Denise César de Oliveira Davidoff do curso de odontologia por me auxiliar com valiosas sugestões no projeto de doutorado. Suas palavras de incentivo me ajudaram no início desta caminhada.

Aos pacientes com fissura e seus familiares que participaram do estudo pela confiança em ceder às amostras de saliva e responder com paciência ao questionário.

Aos meus queridos colegas de trabalho da Unioeste que demonstraram interesse pelo meu estudo, em especial a Celeide de Aguiar Peres pela ajuda. Obrigada coordenador do colegiado professor Dr Gladsom Flor Bertolini. Sua dedicação a pesquisa é uma inspiração para mim. A Karin Comparin minha colega fisioterapeuta, por amenizar meu estresse nos atendimentos de acunputura.

Aos meus colegas de doutorado Alexandre Almeida Webber, Eduardo Tanaka de Castro, Iris Sawasaki, Joseane Rodrigues da Silva Nobre, José Neto da Costa, Juliana Cristina Frare, Satio Inagaki Sagay, obrigada pelo convívio e por ajudarem nas compras das pizzas da APOFILAB. Também o meu agradecimento especial ao Gustavo Kyosen Nakayama pela paciência e ajuda em todo o tempo.

Aos acadêmicos do curso de Fisioterapia que forneceram as amostras de saliva e os acadêmicos da odonto Dayane Plotz e Pedro Henrique Kusdra que ajudaram a preencher alguns dos questionários e coletar algumas amostras.

E por fim, e não menos importante, à minha abençoada, amada e querida família:

Ao meu esposo, Maurício Bertolossi Moreira por sempre me apoiar em todas as minhas conquistas da vida acadêmica. Exemplo de lucidez e serenidade, meu porto seguro. Obrigada pelo seu amor e alegria e por ter me ajudado a conseguir finalizar esse trabalho abrindo mão da minha companhia em diversos momentos.

Aos meus filhos queridos Henrique e Guilherme que me ajudaram nos momentos em que estive ausente em períodos tão difíceis para vocês como adaptação a vida de trabalhador, início de graduação e ensino médio, exames de habilitação, campeonatos de tênis, viagens, torneios e treinamentos. Perdoem-me pelas vezes que não consegui ser a mãe que vocês precisavam pela falta de tempo devido à conclusão deste trabalho. Meu amor por vocês sempre será eterno, pois são heranças de Deus pra mim.

Ao meu pai, Oneron Brustoloni Pinto e a minha mãe Maria Helena Salvati Pinto por me ajudarem a conseguir mais esta conquista. Sem vocês seria impossível. Obrigada pelo amor, dedicação e exemplo de vida que vocês sempre foram pra mim. Não tenho palavras para agradecer! A minha querida irmã Marion Salvati Sonda pelas palavras de ânimo e pelas orações e pelos irmãos Glauco Salvati Pinto e Jeferson Salvati Pinto e aos demais que se preocuparam e torceram por mim.

A todos os amigos e amigas de perto e de longe que me incentivaram e oraram por mim para a finalização deste trabalho. A minha querida amiga irmã, Nete Castro Silva, que ajudou na embalagem das primeiras amostras, minha querida amiga Andréa Cristina de Lima pela força inspiradora, a Terezinha José minha ajudante, pelas amigas Isabel Krieger e Luciana Waldoff Paredes que oraram por mim toda a semana e ao Juarez Resende pela ajuda nos

questionários, bem como minha amiga Angela P. Matter pela revisão do português.

Enfim, agradeço a todos os que de alguma forma fizeram parte deste trabalho. Eu sozinha não conseguiria dar conta de tudo. Deus usou cada um de alguma forma muito especial para me ajudar ao longo desta caminhada.

Obrigada a todos!

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Polimorfismos genéticos.....	46
Tabela 2. Características dos pacientes.....	49
Tabela 3. Extensão das FL/PNS	50
Tabela 4. Distribuição das alterações sistêmicas.....	51
Tabela 5. Características das mães.....	55
Tabela 6. Características dos pais.....	56
Tabela 7. Antecedentes e características dos pais.....	57
Figura 1. Idade dos pais.....	58
Tabela 8. Associação das fissuras e características.....	59
Tabela 9. Distribuição por TDT.....	61
Tabela 10. Cálculo de Hardy-Weinberg.....	62
Tabela 11. TDT em 223 trios.....	64
Tabela 12. TDT em 66 trios de FL.....	65
Tabela 13. TDT em 157 trios de FLP.....	66
Tabela 14. Distribuição haplótipos <i>XRCC1</i> e <i>ERCC2</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADPRT - Adenosine diphosphate polyribosyl transferase
APOFILAB - Associação dos Portadores de Fissura Labial
BER - Base Excision Repair / Reparo por excisão de bases
CAIF - Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Lábio-Palatal
CEAPAC - Centro Especializado de Atendimento e Pesquisa em Alterações Cranianas
DSBR - Double Strand Break Repair / Reparo de quebra na dupla fita
ECLAMC - Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas
ERRC2 - Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency group 2
FL-Fissura labial
FL/PNS - Fissuras lábio-palatinas não-sindrômica
FL/Ps - Fissuras lábio-palatinas
FO - Fissuras orais
FP-Fissura palatal
FS-Fissura submucosa
GWAS-Estudos de associação de larga escala genômica
HR – Homologous Recombination / Recombinação homóloga
HRAC- USP- Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRF6- Fator de regulação interferon 6
MAF-Menor frequência alélica
MLH1 - MutL homologue 1
MMR - Mismatch Repair / Reparo de pareamento errôneo
MSX1- Muscle Segment Homeobox
NER - Nucleotide Excision Repair / Reparo por excisão de nucleotídeos
NHEJ - Non Homologous end Joining /Junção não homóloga de extremidades
OGG1 - Human oxaguanine glycosylase 1
SESA - Secretaria de Estado da Saúde do Paraná
TDT- Teste de desequilíbrio de transmissão

TGF α - Fator de crescimento transformante alfa

XPD - *Xeroderma Pigmentosum Group D*

XRCC1 - *X-ray cross complementing defective repair in Chinese hamster cells1*

XRCC3 - *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells*

1 INTRODUÇÃO

As anomalias congênitas em seres humanos atingem cerca de 3% de todos os nascidos vivos. As fissuras lábio-palatinas (FL/Ps) correspondem à malformação facial mais comum ao nascimento e podem apresentar-se de forma isolada, considerada como não-sindrômica (FL/PNS) ou estar acompanhada por algumas outras alterações, caracterizando uma síndrome (Leslie & Marazita, 2013). A prevalência das FL/PNS pode variar bastante de acordo com o grupo étnico, a região geográfica e os fatores socioeconômicos (Jagomägi *et al.*, 2010). Dados epidemiológicos brasileiros demonstram uma variação entre 0,36 a 1,46 para cada 1000 nascidos vivos (Martelli-Júnior *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009).

Nos países em desenvolvimento, o impacto das fissuras orofaciais ainda está por ser reconhecido e os custos com o tratamento ainda são difíceis de serem mensurados. Somam-se a isso problemas de ordenação e hierarquização do sistema público de saúde, bem como de equidade de acesso aos serviços disponíveis, tornando a assistência inacessível a muitos pacientes e seus familiares (Marazita *et al.*, 2002). Por outro lado, o ônus do não tratamento ou tratamento ineficiente, em termos de morbidade, incidência de distúrbios emocionais, estigmatização, exclusão social quanto às oportunidades educacionais e profissionais e de não inserção no mercado de trabalho, recai sobre o afetado, uma vez que as FL/PNS podem afetar além da estética, a sucção, alimentação, fala e audição e também representar maior susceptibilidade a infecções e a distúrbios psicológicos, requerendo assim assistência multiprofissional por períodos prolongados (Trindade *et al.*, 2007).

As FL/PNS são etiologicamente heterogêneas e fatores ambientais e genéticos são determinantes importantes (Dixon *et al.*, 2011; Mangold *et al.*, 2011). Essas características conferem uma dimensão ainda maior ao sofrimento dos envolvidos, seja pelo suposto peso da culpa, seja pelo espectro do risco de recorrência e sua extensão a outros membros da família. Por essas razões, a avaliação genético-clínica e o aconselhamento genético são etapas inalienáveis do acompanhamento dos pacientes com FL/PNS e os estudos recentes visam

atender essa necessidade, tentando cada vez mais, evoluir no entendimento dos fatores causais com a identificação de novas variantes genéticas, de fatores de risco ambientais e de interações multifatoriais. Este conhecimento pode, eventualmente, resultar em uma melhor prevenção, tratamento e prognóstico para os indivíduos afetados (Dixon *et al.*, 2011; Mangold *et al.*, 2011; Kohli & Kohli, 2012).

Interações multifatoriais na etiologia das FL/PNS são bastante discutidas e os resultados variáveis (Zhu *et al.*, 2009). Estudos demonstraram a relação do tabagismo materno durante o primeiro trimestre de gestação e a ocorrência da FL/PNS, considerando o cigarro como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das FL/PNS com um risco aumentado de aproximadamente 1,3 vezes entre os filhos de mães fumantes (Wyzynski *et al.*, 1997; Little *et al.*, 2002; Honein *et al.*, 2007). A dificuldade destes estudos é que a suscetibilidade ao cigarro depende da biotransformação dos compostos tóxicos na mãe e no embrião que muitas vezes não é facilmente tangível ou mensurável. Alguns estudos também demonstraram evidências de interações entre tabagismo e polimorfismos genéticos no desenvolvimento das FL/PNS (Shi *et al.*, 2007; Chervier *et al.*, 2008, Wu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012). Em relação ao uso do álcool, há um consenso geral que o consumo excessivo de bebidas alcoólicas durante o primeiro trimestre de gestação é um importante fator de risco para FL/PNS (Munger *et al.*, 1996; Lorente *et al.*, 2000; De Roo *et al.*, 2008). Diferentes atividades de trabalho que favorecem a exposição a diversos compostos químicos utilizados nos processos produtivos, têm sido associadas com o aumento de risco de defeitos ao nascimento, entretanto, muitas destas associações não são facilmente confirmadas (Garlantezec *et al.*, 2009).

Em relação à participação genética nas FL/PNS, muitos estudos com diferentes estratégias estão sendo realizados, incluindo estudos de ligação, caso-controle ou com trios, sequenciamento direto do DNA e estudos 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; Kohli

& Kohli., 2012; Rahimov *et al.*, 2012; Stuppia *et al.*, 2012). Polimorfismo genético é caracterizado pela ocorrência de, pelo menos, dois alelos em um mesmo locus, sendo que o alelo raro deve ser encontrado em uma frequência superior a 1% na população. Até o presente momento, a compilação das informações provenientes de estudos de larga escala genômica que utilizaram densos painéis de marcadores genéticos em diversas populações demonstraram que inúmeros genes e loci gênicos podem estar associados à etiologia das FL/PNS (Grant *et al.*, 2009; Birbaum *et al.*, 2009; Beaty *et al.*, 2010, Mangold *et al.*, 2011). No entanto, apenas 2 destes marcadores foram reproduzidos em diferentes estudos com diferentes populações, os quais estão localizados no gene *IRF6* e em uma região intergênica na região 8q24 (Rojas-Martinez *et al.*, 2010; Mostowska *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2012). Estudos prévios com a população brasileira confirmaram a associação do locus de 8q24 (Brito *et al.*, 2012; Bagordakis *et al.*, 2013), mas a participação do gene *IFR6* ainda é discutida (Paranaíba *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2012).

A estrutura do DNA está constantemente sujeita a agressões de diversas origens, resultando em alterações que se não forem reparadas podem levar à consequências danosas na estrutura e na expressão gênica. Existem vias de sinalização celular, dependentes dos genes do reparo de DNA, para identificar e reparar diferentes tipos de danos à estrutura genômica (Yu *et al.*, 1999; Hoeijmakers *et al.*, 2001; Ronen & Glickman, 2001). Reparar o dano ao DNA é fundamental, visto que o desenvolvimento embrionário requer um número suficiente de células que percorrem processos de proliferação e diferenciação celular. Quaisquer alterações nas funções de reparo do DNA, especialmente aquelas que ocorrem durante períodos críticos da morfogênese, podem resultar em proliferação anormal ou morte celular, o que aumenta significativamente a probabilidade de que o embrião venha a desenvolver malformações congênitas (Vinson & Hales, 2002). Interessantemente, poucos estudos analisaram esta associação até o presente momento, destacando-se o trabalho de Olshan *et al.*, 2005.

Assim sendo, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de descrever o perfil de indivíduos com FL/PNS na região oeste do Paraná e a sua associação com as características clínicas, demográficas e ambientais. Adicionalmente, avaliamos a associação de polimorfismos genéticos em genes que codificam enzimas do sistema do reparo do DNA na susceptibilidade das FL/PNS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas (FL/PNS)

As FL/Ps representam as malformações congênitas mais frequentes na região craniofacial e são caracterizadas por uma região de descontinuidade do lábio e/ou palato (Mossey *et al.*, 2009; Mirfazeli *et al.*, 2012). A classificação das FL/Ps depende da região anatômica envolvida e se divide basicamente em 4 grupos: fissuras pré-forame incisivo ou, simplesmente, fissuras labiais (FL), fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP), fissuras transforame incisivo ou fissuras lábio-palatinas (FLP) e fissuras raras da face (Spina *et al.*, 1972). A FL é o resultado da não fusão das proeminências nasais e maxilares, e a FP ocorre quando os processos palatinos deixam de se fundir, e quando surge à falha nos dois processos ocorre a FLP (Shkoukani & Vong, 2013). Baseando-se em evidências embriológicas e epidemiológicas, a FL é considerada uma variante menos intensa da FLP e ambas são classificadas juntas no grupo das fissuras labiais com ou sem fissura palatina (FL±P) (Moore, 1984; Marques *et al.*, 1997; Gonzaga *et al.*, 2001; Harville *et al.*, 2005; Jugessur, 2009; Grossem *et al.*, 2010). Na maioria dos casos (70%), as FL/Ps se manifestam de forma não-sindrômica, ou seja, sem malformações ou alterações adicionais (FL/PNS). O restante das FL/Ps é considerada sindrômica, dentro de um universo de mais de 500 síndromes diferentes já descritas (Nopoulos *et al.*, 2007).

Além das alterações na estética facial, na fala e na audição, outras comorbidades associadas à FL/PNS têm sido descritas ao longo dos anos em diversos estudos (Santos *et al.*, 2006; Nopoulos *et al.*, 2007). Entre as primeiras complicações está a dificuldade no aleitamento materno, resultando em dificuldades no ganho de peso e desenvolvimento da criança (Montagnoli *et al.*, 2005; Cunha, 2004). Pesquisas com 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.*, 1988; Weinberg *et al.*, 2013). A literatura também tem sido categórica em reportar um maior risco 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 (Nishi *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2002; Bille *et al.*, 2005; Frebourg *et al.*, 2006; Taioli *et al.*, 2010; Martelli *et al.*, 2012). No que diz respeito às alterações no desenvolvimento da dentição, as anomalias dentais também têm sido cada vez mais investigadas e detectadas com maior frequência em indivíduos com FL/PNS (Paranaíba *et al.*, 2014). Além da saúde física, já se tem apontado o alto impacto das FL/PNS na saúde mental dos afetados, uma vez que estes podem apresentar um maior risco em desenvolver distúrbios psiquiátricos (Chistensen & Mortensen, 2002) e problemas psicológicos diversos como a depressão (Lima *et al.*, 2014), que interferem na vida social (Marcussom *et al.*, 2002; Kapp & Simon 2004; Marció, 2006; Noor & Musa, 2007; Trindade *et al.*, 2007). Todas estas complicações, vastamente estudadas, 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 (Wheby & Cassell, 2010). O que pode acarretar ainda risco de menor expectativa de vida útil e um aumento de mortalidade e morbidade quando comparados a indivíduos não afetados (Chistensen *et al.*, 2004).

Devido à complexidade das manifestações clínicas, os indivíduos afetados por FL/PNS necessitam de acompanhamento especializado e assistência integral a longo prazo em centros de referência de alta complexidade. Estes serviços diferenciados devem ser oferecidos por uma equipe de saúde interdisciplinar experiente, composta por médicos em diferentes especialidades (pediatra otorrinolaringologista, geneticista e cirurgião plástico), dentistas, fonoaudiólogo, psicólogo, nutricionista, fisioterapeuta, enfermeiro, assistente social, pedagogo, entre outros (Paranaíba, 2010; Aquino *et al.*, 2011; Souza & Raskin, 2011). Muitas vezes o atendimento eletivo e mais complexo, como as cirurgias corretivas ou reparadoras, por exemplo, é realizado nestes centros de alta complexidade, e o tratamento das demais comorbidades em centros de baixa e média complexidade onde reside o fissurado. O Paraná, estado onde foi realizada a análise

epidemiológica deste estudo, no ano de 1992, criou um centro de alta complexidade denominado Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Lábio-Palatal (CAIF), localizado na cidade de Curitiba, e que até o momento atendeu mais de 9.000 pacientes com deformidades craniofaciais, entre elas as FL/PNS. Este serviço é mantido pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA), e todo atendimento é conveniado ao Sistema Único de Saúde (SUS).

Na reabilitação do indivíduo fissurado destaca-se a importância das associações e grupos de apoio aos pais, favorecendo a troca de experiências, sem contar que a parceria entre profissionais da saúde e pais pode gerar um atendimento abrangente que se estende desde a provisão de informações, aumento da consciência e atividades sociais, até a formação de grupos dedicados a arrecadar recursos para compra de equipamentos e pesquisa. Na cidade de Cascavel, onde foi realizada parte da coleta de dados e o estudo epidemiológico, existe a Associação dos Portadores de Fissura Labial – APOFILAB visando assistência aos indivíduos fissurados de toda a região oeste do Paraná. Nesta associação, os indivíduos fissurados dispõem de médico pediatra, dentista, ortodontista, nutricionista, assistente social e uma equipe pedagógica, que visa prestar auxílio nos déficits escolares ou de aprendizado dos alunos fissurados. A mesma faz o acolhimento da família desde a fase inicial do diagnóstico, realizando visita ao fissurado logo após o nascimento na fase hospitalar, e em seguida, providencia todos os encaminhamentos para o CAIF em Curitiba. Em Cascavel no ano de 2012, foi inaugurado um novo serviço de atendimento ao fissurado, junto ao Hospital da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (HUOP), que é o Centro Especializado de Atendimento e Pesquisa em Alterações Cranianas (CEAPAC). Todos esses três serviços visam prestar atendimento especializado ao fissurado.

Tendo em vista essa ampla variedade de especialidades envolvidas na reabilitação, cada vez mais, percebe-se a necessidade de uma padronização na intervenção, visando uma rotina mais homogênea entre os serviços, favorecida pelo estabelecimento de protocolos de atendimentos, e objetivando uma melhor

sistematização entre os centros de reabilitação (WHO, 2002; Monlléo & Lopes, 2006; Paranaíba, 2010). Sabe-se que o tratamento modifica a rotina dos indivíduos fissurados e seus familiares, representando um grande impacto e onerando, em muito, a saúde pública, devido aos custos elevados e a duração prolongada do tratamento especializado, uma vez que, na maioria dos casos se estende desde a infância até o início da vida adulta (WHO, 2002; Mossey *et al.*, 2009; Cassel *et al.*, 2008; Sandrini *et al.*, 2005; Ngai *et al.*, 2005). Nos Estados Unidos, por exemplo, o custo de um paciente com FL/PNS até a vida adulta foi considerado até 25 vezes mais elevado quando comparado a pacientes sem alterações, (Boulet *et al.*, 2009). No Brasil, os custos socioeconômicos ainda não estão bem definidos.

2.2 Embriologia do lábio e palato

Uma série de eventos de alta complexidade, determinados pela interação entre sinalizadores moleculares e fatores de transcrição, juntamente com a interação e aquisição de especialização celular, são cruciais para o desenvolvimento normal da face durante a embriogênese (Stainer & Moore, 2004). O momento exato do posicionamento das proeminências faciais durante o desenvolvimento embrionário é determinante, e qualquer incidente pode resultar na formação das FL/Ps. A extensão da lesão pode variar de acordo com o período e a duração das intercorrências durante a embriogênese (Wilkie *et al.*, 2001). A face origina-se de uma série de intumescências, geralmente denominadas “processos”, e a formação do lábio e palato dependem de uma sequência ordenada de interações, incluindo migração, proliferação, diferenciação e apoptose celular, que são influenciados pelos já citados fatores de transcrição e sinalizadores moleculares (Mossey *et al.*, 2002; Stainer & More, 2004).

Parte do desenvolvimento facial inicia-se no final da 4ª semana de gestação (Mossey *et al.*, 2009). As células da crista neural, oriundas do tubo neural anterior, migram para formar a primórdia da face, surgindo dela o processo nasal medial e lateral, que se fundem ao processo maxilar, para formar a parte central do lábio

superior, o palato primário e o nariz (Marazita & Money, 2004). O palato primário aloja os dentes incisivos da maxila, dando origem à parte anterior do forame incisivo e também contribuindo para a formação do lábio e a porção anterior das maxilas (Rice *et al.*, 2005). O desenvolvimento do palato secundário inicia-se na sexta semana, a partir de duas projeções mesenquimais que se estendem das faces internas das saliências maxilares, formando o palato duro (osso), o palato mole (o velum) e o osso alveolar e basal da maxila e se estende na direção posterior a partir do forame incisivo (Wilkie *et al.*, 2001).

As FL/Ps podem resultar de defeitos primários na palatogênese expressos morfologicamente devido ao crescimento deficiente, falha na elevação, contato ou fusão dos processos palatinos ou ruptura de pós-fusão (Cohen, 2002). Durante a oitava semana de vida intrauterina, os processos palatinos giram a partir de uma posição vertical em torno da língua, e se elevam em aproximação horizontal, com um ligeiro atraso neste processo observado em embriões do sexo feminino (Mooney & Siegel, 2002). Na nona semana, as placas palatinas que aparecem como duas extensões no lado interno da maxila ao longo da superfície lateral da língua acabam sofrendo uma rápida transformação horizontal, movendo-se sobre a língua e fusionando-se uma contra a outra e com o septo nasal (Tapadia *et al.*, 2005). Uma vez que os processos palatinos são elevados e se aproximam, eles se aderem na superfície de contato, sendo a fusão na costura ao longo das bordas mediais e a apoptose do epitélio mecanismos essenciais para o desenvolvimento normal do palato secundário (Marazita *et al.*, 2004). Na décima segunda semana os processos fusionados dos palatos e do septo nasal estão completos, dividindo o espaço oronasal em cavidades oral e nasal, favorecendo a possibilidade da mastigação e respiração ocorrerem de forma sincronizada e independente (Mooney & Siegel, 2002).

Fatores genéticos e ambientais, que inibam o fluxo de células da crista neural ou diminuam o seu número, podem afetar as massas celulares, tornando o contato entre as proeminências faciais inadequado ou impossível. O epitélio que cobre o mesênquima pode não sofrer morte celular programada, impedindo a

fusão dos placóides. Portanto, qualquer mudança na posição do placóide nasal ou crescimento direcional anormal das proeminências faciais pode resultar em FL/Ps (Yoon *et al.*, 2000). Algumas estruturas adicionais que podem ser afetadas pela fissura são a dentição, tendo como fenótipo mais frequente o deslocamento dental e a agenesia dentária, os maxilares, o osso alveolar e a musculatura labial. Como defeitos secundários podem aparecer os distúrbios de crescimento ou alterações da morfologia das estruturas craniofaciais, incluindo a base craniana, e ainda pode ocorrer a obstrução mecânica devido a elevação dos processos palatinos pelo tamanho, ou posicionamento anormal da língua (Sperber, 2002).

2.3 Epidemiologia das FL/PNS

Existem diferenças entre raças no acometimento das FL/PNS. Indivíduos de origem asiática ou ameríndia estão entre os mais afetados com uma prevalência de 1/500 nascidos vivos, enquanto que a menor prevalência é encontrada em indivíduos com ascendência africana 1/2.500 (Dixon *et al.*, 2011). Já as populações caucasianas demonstram uma taxa de prevalência intermediária com cerca de 1 indivíduo afetado para cada 1.000 nascidos vivos (1/1.000) (Parada *et al.*, 2012).

Inúmeros estudos, ao longo das décadas, em diferentes países, têm revelado a diversidade epidemiológica das FL/PNS. Referente aos estudos internacionais, entre os relatos clássicos destaca-se o russo Frobélius como sendo um dos pioneiros a analisar os aspectos epidemiológicos em fissurados, registrando entre os anos de 1833 a 1864, Frobélius encontrou 118 casos de fissura, o que correspondeu a uma prevalência de 0,065% para a população russa (Capellozza & Silva, 1994).

Nos países subdesenvolvidos, os estudos sobre a prevalência das FL/PNS ainda são escassos se comparados aos países mais desenvolvidos. Na América do Sul, Menegotto e Salzano (1991) analisaram dados de 849.381 nascidos vivos em 56 hospitais de 8 países e revelaram que o Equador apresenta a maior prevalência (1,36/1.000) e a Venezuela a menor (0,60/1.000). Este mesmo estudo

revelou que o Brasil apresenta uma prevalência de 0,85/1.000 nascimentos com FL/PNS. Outra fonte de informação importante para o monitoramento das malformações é a rede de maternidades que trabalha em colaboração com o ECLAMC (Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas). Entretanto, as maternidades Brasileiras que fazem parte da rede ECLAMC não cobrem nem 2% dos nascimentos do país (Castilla, 2004). Segundo dados deste grupo entre os anos de 1982 a 2002, a prevalência de fissura orofacial não-sindrômica foi de 1,5 a cada 1.000 nascidos vivos (1,5/1.000) (Lopes, 2010).

Entre outros estudos realizados no Brasil, Nagem Filho *et al.* (1968) encontraram uma prevalência de 1,54/1.000. Fonseca & Resende (1971) analisaram os registros de 67.321 nascidos vivos em um hospital materno-infantil da cidade de São Paulo e encontraram uma taxa de 1,48/1.000. Em Porto Alegre-RS destacam-se três estudos: um feito por Cândido (1978), que encontrou uma prevalência de 0,88/1.000 nascido-vivos no período de 1970-1974; outro realizado por Pinto *et al.* (1990) que encontrou 1,23/1.000 e o último realizado por Collares *et al.* (1995) que encontrou uma prevalência de 1,32/1.000. Loffredo *et al.* (2001) em um estudo entre 1975 e 1994, usando como fonte os dados do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC-USP), os dados do Ministério da Saúde (DATASUS) e os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), encontraram uma prevalência de 0,47/1.000 nascidos vivos.

França & Locks (2003) determinaram a prevalência das FL/PNS na cidade de Joinville, Santa Catarina, no período de 1994 a 2000, registrando 1,24/1.000 nascidos vivos. Cunha *et al.* (2004), por meio de estudo caso-controle realizado em todas as maternidades da cidade de Pelotas-RS no período de 1990 a 2002, chegaram à prevalência de 0,78/1.000 nascidos vivos. Nunes (2005), em um estudo retrospectivo, observou que a prevalência de FL/PNS no Município de Campos dos Goytacazes - RJ, entre os anos de 1999 e 2004, foi de 1,35 casos por 1.000 nascidos vivos. Rezende e Zollner (2008), em Taubaté, São Paulo, por meio da análise de arquivos do SINASC, observaram uma prevalência de 1,49 a cada 1.000 nascidos vivos. Martelli-Júnior *et al.* realizaram dois estudos

epidemiológicos em Minas Gerais, o primeiro (2006) foi no período de 1986 a 1998 e o segundo (2007), no período de 2000-2005, na cidade de Alfenas-MG, observando uma prevalência de 1,46 para cada 1.000 nascidos vivos. Gardenal *et al.* (2011) encontraram no Mato Grosso do Sul uma prevalência de 0,49 para cada 1.000 nascidos vivos. Rodrigues *et al.* (2009), por meio do DATASUS de todas as regiões brasileiras, entre o período de 1998-2002, registraram uma prevalência de 0,36 para cada 1.000 nascidos vivos.

Dos estudos epidemiológicos mais relevantes que já foram realizados no estado do Paraná destacam-se o de Souza & Raskin (2011), que por meio do banco de dados do CAIF, durante os anos de 2002 a 2008, observaram a ocorrência de 1.084 casos, e estimaram a prevalência das FL/PNS no estado em 1 afetado para cada 1.010 crianças nascidas vivas, ou seja 0,99/1.000. Também observaram 1 para 1.334 nascimentos com FL±P (0,75/1.000) e de 1 para 3.953 nascimentos com FP (0,25/1.000). Na cidade de Cascavel, região oeste do Paraná, onde foi realizado este estudo, Scheffer & Davidoff (2007) relataram uma prevalência de 1,88 casos para cada 1.000 nascidos vivos, acompanhados pelo período de 2000 a 2006.

Uma variabilidade interessante pode ser observada na incidência das FL/PNS em relação ao gênero. As FL±P têm uma prevalência maior em indivíduos do gênero masculino, enquanto as FP isoladas são mais frequentes no gênero feminino. (Mossey *et al.*, 2009; Martelli *et al.*, 2012). Aproximadamente 75% das fissuras que envolvem o lábio são unilaterais. Entre as fissuras unilaterais, o lado esquerdo é duas vezes mais afetado que o lado direito (Gundlach & Maus, 2006). A FL±P ocorre duas vezes mais frequente que a FP (Jugessur, 2009; Martelli *et al.*, 2012).

Mesmo alguns estudos apontando que o fator socioeconômico pode interferir no aparecimento das fissuras, a sua influência na prevalência não foi conclusivamente confirmada (Carmichael *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008; Scheffer & Hirata, 2010). Possíveis explicações para as diferenças na prevalência entre origens geográficas e status socioeconômico incluem a

influência dos fatores ambientais, tais como os hábitos maternos na gravidez, nutrição e acesso a saúde. (Leslie & Marazita, 2013).

2.4 Etiologia das FL/PNS

Embora diversos fatores etiológicos tenham sido descritos em associação com a etiologia das FL/PNS, vários estudos identificam a falta de poder estatístico para determinar a real ocorrência de certos defeitos. O entendimento dos mecanismos de ação dos fatores etiológicos é dificultado pela impossibilidade de se avaliar o grau de intensidade da sua ação sobre a embriogênese, além das limitações éticas que envolvem estudos de reprodução humana (Leslie & Marazita, 2013).

2.4.1 Fatores ambientais

As FL/PNS podem ocorrer pela influência de agentes teratogênicos que exercem danos em períodos críticos do desenvolvimento embrionário. As complexidades dos mecanismos envolvidos neste processo se diferem quanto ao tipo, frequência e gravidade, resultando na diversidade das manifestações clínicas das fissuras (Baptista & Leal, 2007). A literatura descreve várias hipóteses que buscam apresentar e definir agentes teratogênicos que atuam durante a gestação. (Leite *et al.*, 2009). Dessa forma história pregressa da gravidez é importante para detectar se houve exposição, e determinar quais os agentes toxicogênicos, sua dose e tempo de exposição, que possam contribuir para o nascimento de uma criança com FL/PNS (Mossey *et al.*, 2009). Entre os mais estudados ou descritos, destacam-se os agentes infecciosos, as substâncias químicas, a radiação ionizante, as drogas lícitas ou ilícitas, os hormônios e a deficiência nutricional, além de outros fatores que serão descritos a seguir.

Um dos aspectos que podem influenciar as malformações congênitas é a desnutrição materna durante a gestação, pois esta é capaz de diminuir a capacidade de produção de hormônios e nutrientes indispensáveis ao feto, sendo considerado um elemento agravante ao aparecimento das FL/PNS (Krapels *et al.*,

2006). A ingestão adequada de zinco, niacina, ácido ascórbico, ferro e magnésio supridos por meio dos alimentos ou da suplementação vitamínica pode reduzir o risco de malformações (Krapels *et al.*, 2006; Johnson & Little, 2008). Além destes, a ingestão do ácido fólico também tem sido amplamente estudada na prevenção das FL/PNS (Canfield *et al.*, 2005; Boyles *et al.*, 2008; Little *et al.*, 2008). Estudos abrangendo o envolvimento de variantes polimórficas em genes como *MTHFR* que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico já foram descritos e confirmam um risco aumentado para o surgimento de FL/PNS (Shaw, 2003; Bufalino *et al.*, 2010).

A exposição a radiações pode proporcionar a destruição das células da placa neural, assim como alterar sua capacidade de multiplicação e diferenciação, alterando a embriogênese normal (Shafi *et al.*, 2003). Adicionalmente, Vieira & Orioli (2002) destacaram que doenças infecciosas parecem ter uma ação danosa sobre o andamento da gravidez, uma vez que o embrião pode ser atingido por certas bactérias, protozoários, vírus, micoplasmas, espiroquetas, fungos ou pseudomonas, responsáveis por enfermidades na mãe. Evidências epidemiológicas indicam forte relação do tabagismo e a presença das FL/PNS, pelo provável efeito do monóxido de carbono com decréscimo do oxigênio resultante da biotransformação dos compostos tóxicos na mãe e no embrião (Lorent, 2000b; Honein *et al.*, 2007). 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 um estudo clássico caso-controle realizado por Loffredo *et al.* (1994) e outro 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 outros autores (Beaty *et al.*, 1997; Chervier *et al.*, 2008). Entre os registros que confirmam a associação de tabaco com FL/PNS, destaca-se o estudo de Wyszynski *et al.* (1996), que no período de três décadas (de 1966 a 1996), em um total de 10 estudos analisados, registrou que o risco atribuível ao fumo é de 11% para FL±P e 12% para FP. Outro estudo de meta-análise, que incluiu 22 trabalhos

publicados no período de 1996 a 2001, também evidenciou o risco de FL/PNS e o hábito de tabagismo (Little, 2002). O estudo de Zhang *et al.* (2013) com 304 pacientes com FL/PNS de origem chinesa também evidenciou uma forte associação entre tabagismo e FL/PNS.

Interessante observar que o tabagismo durante a gravidez é também associado com malformações dos membros, espinha bífida, recém-nascido com peso e estatura menor, se comparados com os filhos de mães não fumantes e ainda aumento elevado no risco de prematuridade (Friedrich *et al.*, 2003).

Os estudos mais atuais, que dispõem de acesso aos avanços tecnológicos da biologia molecular, têm avaliado a associação do tabaco também com polimorfismos genéticos, bem como a influência de determinados genes que atuam nas vias de desintoxicação metabólicas no desenvolvimento da FL/PNS. Registros demonstram associações significantes entre variações polimórficas nos genes GSTM1 e GSTT1, e tabaco, em FL/PNS (Lammer *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2007; Chevrier *et al.*, 2008). Visando correlacionar as variáveis genéticas e ambientais, um estudo mais recente revelou uma forte interação entre tabagismo na gravidez e os polimorfismos nos genes *SLC2A9* e *WDR1*, localizados no cromossomo 4p16.1, em pacientes com FL/PNS (Wu *et al.*, 2014).

O álcool é considerado o teratígeno mais consumido a nível mundial e o seu uso durante o início da gestação pode contribuir significativamente para o aparecimento de várias alterações congênitas (Leite, 2002). Alguns trabalhos consideram que a contribuição do álcool para o desenvolvimento de FL/PNS é significativa (Romitti *et al.*, 1999; Lorente *et al.*, 2000a; Chevrier *et al.*, 2005; De Roo *et al.*, 2008). No entanto, outros consideram os resultados associando FL/PNS e álcool inconsistentes (Meyer *et al.*, 2003; Romitti *et al.*, 2007). Estes resultados podem ser justificáveis pela dificuldade em mensurar a quantidade, a frequência e o tempo do consumo do álcool em gestantes. Também, nem sempre a bebida alcoólica é consumida exclusivamente, havendo frequentemente a associação deste agente teratogênico com outros, como tabaco, drogas e ainda aspectos nutricionais (Krapels *et al.*, 2006). Já em pesquisas abordando a suscetibilidade

genética e consumo de álcool, Romitti *et al.* (2007) observaram que a presença do alelo variante no gene *MSX1* (gene que é intensamente expresso durante o desenvolvimento facial durante a embriogênese), e o consumo de apenas 1 dose semanal de bebida alcoólica pela mãe, pode ter sido responsável por um aumento no risco de desenvolvimento de FL/PNS.

Além do tabaco e do álcool, uma variedade de drogas como a maconha, cocaína e o craque, entre outras, já foram descritas como teratogênicas (Lorente *et al.*, 2000a; Lammer, 2004; Yang *et al.*, 2014). O uso de alguns medicamentos também pode aumentar o risco de malformações congênitas, entre eles: a talidomida, os hormônios androgênicos, os anticonvulsivantes, os anticoagulantes, o ácido retinóico, os antibióticos e os anti-inflamatórios, os quais podem atuar nas diversas fases da morfogênese (Abdo & Machado, 2005). Entretanto, em vista das interações complexas da sua ação na patogenia da maioria das malformações é difícil estabelecer o exato papel de cada um destes teratogênicos. Devido a dúvidas com relação aos riscos fetais de medicamentos administrados pela gestante, é de boa norma evitar, durante todo o período de gravidez, o uso indiscriminado de medicamentos, sendo que toda a prescrição deve ser criteriosa, atendendo às necessidades e salvaguardando os interesses fetais.

O número de mulheres em idade fértil no mercado de trabalho cresce a cada dia, por isso é importante compreender e identificar se as mesmas não estão expostas a processos produtivos que favoreceriam o contato com agentes agressores, tais como os agentes físicos, químicos e biológicos, que poderiam representar risco para a sua integridade física (Garcia, 1998, 2000). É importante ressaltar que no ambiente de trabalho, no que se refere aos fatores fisiológicos, homens e mulheres diferem nos mecanismos que envolvem o metabolismo, absorção, distribuição, e eliminação das substâncias químicas (Bianchi *et al.*, 1997; Garlantezec *et al.*, 2009). Tais diferenças precisam ser levadas em conta, quando da adoção de medidas protetoras às condições de trabalho de risco ou insalubre, visando colocar em vigor metodologias preventivas focadas na saúde e segurança do trabalhador (Mendes & Waissmann, 2003).

Em mulheres grávidas ocorrem mudanças importantes no que tange aos aspectos fisiológicos e da composição corporal, e estas adaptações são necessárias para o sucesso da gravidez, crescimento e desenvolvimento fetal (Desrosiers *et al.*, 2012). A literatura reúne evidências da associação entre malformações congênitas e a exposição ocupacional a agentes químicos, comumente encontrados em áreas industriais, como solventes e metais pesados e os pesticidas nas áreas agrícolas (Chevrier *et al.*, 2007). Entre as substâncias químicas que produzem risco ao feto, além dos pesticidas de uso agrícola, listam-se também o sanitário e o doméstico. Segundo sua atividade, os defensivos agrícolas são classificados em inseticidas, acaricidas, fungicidas, raticidas, herbicidas, nematocidas e moluscocidas. Sua entrada no organismo pode ser por via inalatória ou por absorção através das mucosas e pele (Rojas *et al.*, 2010). Diversos estudos têm apontado que a exposição ocupacional das mães a agrotóxicos pode favorecer e aumentar o risco no aparecimento das FL/PNS (Romiti *et al.*, 2007b; Gonzalez *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 2011; Lorente *et al.*, 2000a). Vale ressaltar que a cidade de Cascavel, local onde foi realizada a coleta de dados do nosso estudo, é uma região que subsiste da agricultura, e que alguns genitores, que compuseram os trios que fizeram parte da amostra, tiveram contato com defensivos agrícolas por morarem próximo de lavouras, e outros por rotineiramente manejarem diversos defensivos agrícolas.

Pelos relatos de Leite *et al.* (2002), que se estendem para a região onde foi desenvolvido nosso estudo, têm havido cada vez mais um aumento substancial e drástico no uso de componentes agrícolas, assim como o uso de herbicidas e fungicidas, sendo alguns deles reconhecidos como teratogênicos, mutagênicos ou carcinogênicos, mas ainda assim, relativamente pouca atenção tem sido dada à centenas de formulações químicas e seus efeitos na saúde dos produtores rurais. Um estudo feito pelo nosso grupo com 92 produtores rurais da região oeste do Paraná revelou que muitos deles são negligentes, e não utilizam equipamento de segurança durante o manejo e aplicação de defensivos agrícolas, aumentando o risco de contaminação (Moreira *et al.*, 2009).

Tendo em vista os fatores apresentados, Garcia (2000) levantou a hipótese de que fetos de áreas agrícolas em períodos de pico do uso de agrotóxicos, especialmente no primeiro trimestre, poderiam demonstrar aumento no risco de defeitos congênitos como a FL/PNS. Mesmo se tratando de um estudo com as limitações peculiares, oriundos da dificuldade em quantificar a exposição a estes produtos químicos, este estudo não deve ser desconsiderado, pois essa é uma hipótese que deve ser melhor investigada, já que também foi reafirmada em conclusões de outros estudos (Shawn *et al.*, 1988; Chevier *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2014a).

Além dos fatores ambientais classicamente descritos, já foi observado em alguns estudos a possível influência de enfermidades crônicas, como obesidade e diabetes, no aparecimento das FL/PNS (Beaty *et al.*, 2001; Leite *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2002). Mães diabéticas com filhos fissurados demonstraram a presença de um fator anti-insulina, ligado a albumina, que altera a mobilização proteica e diminui o aporte nutricional às células, alterando seu comportamento e determinando alterações na morfogênese (Abdo & Machado, 2005). O estresse materno tem cada vez mais sido objeto de investigação para intercorrências fetais e foi considerado fator de risco para a FL/PNS (Carmichael *et al.*, 2007). Em estudo recente, Carmichael *et al.* (2014), avaliando um grupo de 1.100 pacientes com FL/PNS, confirmaram que o estresse nos períodos iniciais da gravidez pode aumentar o risco para o aparecimento de FL/PNS.

Em resumo, no que diz respeito às influências ambientais reforçam-se as palavras de Leite *et al.* (2009), que adverte que as populações de países em desenvolvimento, como o Brasil, apresentam características sociais, políticas e econômicas muito particulares para a compreensão de potenciais riscos teratogênicos, aos quais uma mulher grávida possa estar exposta. Essas características incluem: níveis educacionais e econômicos baixos da população, alta incidência de doenças infecciosas, carências nutricionais, prática frequente da automedicação, consumo de bebidas alcoólicas, fumo, droga e pode somar-se ainda uma qualidade ambiental precária, devido às condições socioeconômicas ou

mesmo condições de trabalho insalubres durante a gravidez. Todos estes estudos referentes à exposição ambiental e as FL/PNS, apontam para a importância da investigação deste tema e a realização de novas pesquisas visando elucidar cada vez mais as questões ainda obscuras relacionadas à etiologia das FL/PNS.

2.4.2 Fatores genéticos

Além dos riscos ambientais, diversos pesquisadores têm registrado ao longo dos anos a possível interferência dos fatores genéticos no aparecimento das FL/PNS. Estudos clássicos publicados ao longo dos anos (Trew, 1757; Sproule, 1863; Darwin, 1875; Fogh-Andersen, 1942) já registravam um aumento da frequência das fissuras em familiares de pacientes com FL/PNS. Curtis *et al.*, (1961) demonstraram que o risco de uma segunda ocorrência de FL/PNS em uma mesma família era 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. Interessantemente 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 & Murray, 2005a). 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 & Marazita, 2013)

A análise de segregação (Marazita *et al.*, 1986) e os estudos de gêmeos (Mitchell *et al.*, 2002) sugerem um componente genético para FL/PNS, pois confirmaram a alta taxa de recorrência familiar, sendo o risco para a FL em parentes de primeiro grau estimado em 32%, que é muito mais alta quando comparados a indivíduos sem uma história familiar de FL (Sivertsen *et al.*, 2008). O trabalho de Martelli *et al.* (2010), avaliando a incidência familiar de FL/PNS em 185 pacientes, identificou 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. Se a etiologia das FL/PNS fosse apenas genética, a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos deveria ser de 100%, entretanto, essas taxas sugerem que existe o fator genético, mas, também existem fatores ambientais envolvidos (Kinoshita *et al.*, 1992).

Estudos recentes com abordagens diferenciadas têm sido realizados com o objetivo de identificar os genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial. Alguns genes candidatos para as FL/PNS também foram sugeridos por meio de estudos com síndromes mendelianas apresentando fissura (Kondo *et al.*, 2002), modelos experimentais (Juriloff & Harris, 2008), citogenética (Brewer *et al.*, 1999; Higgins *et al.*, 2008), análises de expressão gênica (Yu *et al.*, 1999; Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2009) e estudos de ligação e associação do genoma (Marazita *et al.*, 2004, 2009; Birnbaum *et al.*, 2009). A análise de ligação procura por co-segregação de alelos para marcadores genéticos de uma doença dentro de famílias. Os estudos de associação têm mais poder uma vez que se utilizam da combinação de ambas, as associação e ligação, e podem ser bem utilizados para estudos de doenças complexas (Mangold *et al.*, 2011).

Para doenças complexas como as FL/PNS, a análise de ligação geralmente é desenvolvida sob a forma de triagem do genoma, ou seja, vários marcadores são selecionados por todo o genoma e genotipados em um conjunto de famílias. As regiões que apresentarem ligação com o fenótipo são então investigadas mais detalhadamente com ensaios específicos. O teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) é um método comumente utilizado, e é considerado um teste de associação na presença de ligação. Este teste uma vez que utiliza a herança em núcleos familiares para testar a associação, e tem como base o estudo de famílias, analisando a correlação entre uma doença complexa e um marcador genético

localizado em um gene candidato ou próximo a ele. O TDT avalia a transmissão de alelos de pais heterozigotos para seus filhos afetados, e determina se a transmissão para o grupo de probandos é estatisticamente diferente do esperado pelas leis mendelianas. Por exemplo, o esperado para a transmissão de um polimorfismo de um dos pais heterozigotos seria em torno de 50% para cada alelo; caso o alelo não esteja na região relacionada à causa do fenótipo. Os resultados do TDT são dados sob a forma de significância, sendo valores menores que 0,05 considerados significativos. Esse tipo de análise tem como vantagem o fato de não exigir famílias numerosas, porém, o número de famílias estudadas deve ser grande, e é necessário ainda que os pais sejam heterozigotos uma vez que o teste avalia a transmissão dos alelos de ambos os pais de forma independente. Isso pode reduzir o número de amostras informativas que podem ser submetidas a este tipo de análise (Pacheco & Moraes, 2009).

Abordagens usando caso-controle ou com trios, sequenciamento direto de DNA e, mais recentemente, estudos de associação de larga escala genômica (GWAS), baseados na comparação de vários polimorfismos comuns entre casos e controles, identificaram a maior parte dos genes e regiões cromossômicas associadas a etiologia das FLP/NS (Dixon *et al.*, 2011; Kohli & Kohli, 2012; Rahimov *et al.*, 2012; Stuppia *et al.*, 2012; Ludwig *et al.*, 2012; Böhmer *et al.*, 2013). Dentre as diferentes regiões cromossômicas, destacam-se a 17p13.1 (Wyszynski *et al.*, 2003), 2p13, 3q27-28, 14q21-24 e 16q24 (Marazita *et al.*, 2004), 8p11-23 (Riley *et al.*, 2007), 19p13.12, 19q12 e 2q22.3 (Vieira *et al.*, 2008b), 9q21, 1p32 e 1q32 (Marazita *et al.*, 2009c), 8q24.21, 18q22 (Grant *et al.*, 2009; Birnbaum *et al.*, 2009), 9q22 (Moreno *et al.*, 2009) 10q25.3, 17q22 e 2p21, (Mangold *et al.*, 2011), 1p22, 20q12 e 1p36 (Beaty *et al.*, 2010), 6q14.2-14.3 (Letra *et al.*, 2010) e 3p11 (Ludwig *et al.*, 2012). A diversidade de eventos embriológicos que contribuem para a formação das estruturas faciais reflete no grande número de genes conhecidos ou suspeitos de estarem envolvidos na formação das FL/PNS (Jugessur *et al.*, 2009; Rojas-Martinez *et al.*, 2010).

O grupo de genes candidatos para FL/PNS não é composto apenas por aqueles envolvidos no desenvolvimento das estruturas da face, mas também por aqueles que são influenciados por perturbações ambientais durante o desenvolvimento embriológico (Prescott *et al.*, 2002).

Dentre os genes associados às FL/PNS, destacam-se: *IRF6* (fator de regulação interferon 6) (Zuchero *et al.*, 2004; Paranaíba *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 homeobox) e *PAX7* (Vieira *et al.*, 2003; Marazita *et al.*, 2004; Zuchero *et al.*, 2004; Marazita *et al.*, 2009; Beaty, 2010; Pan *et al.*, 2011; Lennon *et al.*, 2012; Leslie & Murray, 2012; Ludwig *et al.*, 2012; Butali *et al.*, 2013; Aquino *et al.*, 2013, 2014).

2.5 Genes do reparo do DNA

A integridade do DNA deve ser mantida para que a transmissão das informações ocorra de maneira harmônica, bem como as funções reguladas por ele. Quaisquer perturbações no DNA com consequente alteração nas funções celulares básicas, especialmente aquelas que ocorrem durante períodos críticos da morfogênese, podem resultar em um distúrbio no crescimento ou morte celular, aumentando significativamente a probabilidade do embrião desenvolver malformações congênitas (Vinson & Hale, 2002). A estabilidade do genoma é fundamental e depende não só de um acurado mecanismo de replicação, mas também da reparação dos danos que ocorrem continuamente de maneira espontânea ou induzida no DNA (Dusinska *et al.*, 2006). Essa reparação é determinada pela capacidade das células corrigirem os erros na estrutura do DNA para que não afetem os mecanismos celulares essenciais. Em situações de perpetuação (mutações), os danos podem resultar em efeitos genotóxicos, citotóxicos e de instabilidade genômica (De Boer *et al.*, 2000). Durante o

metabolismo normal do DNA, alterações espontâneas na sua estrutura (mutações espontâneas) podem ocorrer, como por exemplo, pareamento errôneo de bases, desaminação e despurinação (Hoeijmakers, 2001). Podem ocorrer ainda perda das bases do DNA, especialmente em pHs ácidos gerando sítios abásicos (apurínico ou apirimidínico), além de alterações espontâneas, modificações no próprio metabolismo celular ou do ambiente, também podem atuar de maneira significativa na desorganização da estrutura da molécula de DNA (Berra & Menck, 2008). Quando ocorrem algumas das alterações citadas, todos os diferentes sistemas de reparo de DNA atuam visando manter a integridade do genoma humano e garantir a sobrevivência do organismo frente aos possíveis efeitos deletérios ao DNA (Lima *et al.*, 2001).

Mais de 130 genes já foram identificados e classificados em 4 vias principais de reparo do DNA: reparo por excisão de bases (*BER – Base Excision Repair*), reparo por excisão de nucleotídeos (*NER – Nucleotide Excision Repair*), reparo de pareamento errôneo (*MMR – Mismatch Repair*) e reparo de quebra na dupla fita (*DSBR – Double Strand Break Repair*) (Qian *et al.*, 2011; Wood *et al.*, 2001), que inclui recombinação homóloga (*HR – Homologous Recombination*) e junção não homóloga de extremidades (*NHEJ – Non Homologous End Joining*). Para Hoeijmakers (2001), estas vias apresentam muitas proteínas em comum, ou seja, uma determinada proteína pode desempenhar funções em mais de uma via de reparo e os mecanismos são geralmente sobrepostos para garantir a manutenção da estabilidade do genoma. Além disso, cada uma dessas vias é responsável pela correção de danos específicos que podem ocorrer espontaneamente ou por meio da indução de agentes químicos ou físicos (Hoeijmakers, 2001). A seguir serão descritos de forma sucinta os principais mecanismos dos genes de reparos e as enzimas selecionadas para este estudo.

O BER é responsável pela remoção de uma grande variedade de lesões, como bases desaminadas, alquiladas, oxidadas ou ausentes. O passo inicial do BER consiste no reconhecimento e excisão das bases danificadas pelas enzimas DNA glicosilases. Cada DNA glicosilase é específica para um número limitado de

bases modificadas, e pelo menos 12 DNA glicosilases diferentes já foram identificadas em humanos (Jacobs & Shcar, 2012). As DNA glicosilases podem ser monofuncionais e remover somente a base modificada deixando um sítio abásico ou podem ser bifuncionais as quais possuem, além da sua atividade de glicosilase, a atividade de liase. O mecanismo molecular do BER inicia-se primeiramente pelo reconhecimento e excisão das bases danificadas pelas DNA glicosilases sem ou com atividade de liase associada (Lindahl *et al.*, 1999). A excisão da base resulta num sítio abásico sem ou com incisão 3', que é reconhecido por outro grupo de enzimas, as abásica-endonucleases, fazendo a incisão na extremidade 3' ou 5' do sítio abásico, gerando uma lacuna. Esta lacuna é preenchida pela polimerização (ação da DNA polimerase) e ligação (ação da DNA ligase) de novos nucleotídeos à sequência de DNA (Krokan *et al.*, 2002). Após a remoção da base, o reparo pode ser completado por duas vias: a via curta (*Short-Patch Repair*) que remove apenas um nucleotídeo, ou a via longa (*Long-Patch Repair*) que remove de 2-8 nucleotídeos. A escolha de uma das vias é geralmente determinada pela natureza da DNA glicosilase e do sítio abásico resultante, mas também pode depender do momento do ciclo celular e da localização subnuclear do processo. Existem ainda as proteínas secundárias que são conhecidas por desempenharem um papel facilitador no BER, com destaque para as proteínas (XRCC1) e poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1). XRCC1 não tem nenhuma atividade enzimática conhecida, mas funciona como uma molécula de suporte que orchestra a montagem de vários componentes enzimáticos envolvidos no processo de reparo. XRCC1 demonstrou interagir com várias proteínas da BER, incluindo DNA glicosilases múltiplas, DNA polimerase β , APE1 ligase III, PNKP, Tdp e APTX (Caldecot, 2003). Adicionalmente, a PARP-1 também interage fisicamente com XRCC1. PARP1 é uma proteína nuclear abundante que atua como um sensor molecular. Após a ligação ao seu alvo de DNA, PARP-1 catalisa a ligação da proteína poli (ADP-ribosi) (PAR). Uma vez formada esta ligação, PAR permite o recrutamento de proteínas de reparo, como XRCC1. Ao mesmo tempo, a carga negativa de PAR resulta na libertação de

PARP-1, permitindo o acesso de outras proteínas do reparo ao dano do DNA (Li, 2008). Em geral, o BER é um processo de múltiplos passos que requer a atividade sequencial de várias proteínas que entram em ação conforme o tipo de dano a ser reparado.

O NER é um dos mais importantes processos de reparo de lesões no DNA e tem sido intensivamente estudado. Este mecanismo apresenta uma enorme versatilidade e universalidade em reparar lesões que causam distorção na dupla-hélice do DNA, geradas principalmente por agentes exógenos (De Laat *et al.*, 1999; Petit *et al.*, 1999; De Boer *et al.*, 2000). Por exemplo, as lesões no DNA induzidas pela radiação ultravioleta são corrigidas pelo sistema NER (De Laat *et al.*, 1999; De Boer *et al.*, 2000). O princípio bioquímico geral do NER é bastante conservado desde bactérias até humanos (Cleaver *et al.*, 2009), tendo sido primeiramente caracterizado em *E. coli* e, posteriormente, em outros organismos (Costa, 2003). O processo do NER em eucariontes envolve a ação de aproximadamente 30 proteínas que atuam em cinco passos sucessivos: 1) reconhecimento da lesão; 2) abertura da dupla hélice de DNA onde está localizada a lesão; 3) dupla incisão nas extremidades dessa lesão; 4) síntese do novo DNA utilizando como molde a fita não danificada e 5) ligação da porção 5' da nova fita sintetizada à sequência original (De Boer *et al.*, 2000). O NER possui atividade heterogênea em regiões distintas do genoma, sendo mais rápido na fita transcrita de um gene ativo. Esse processo, dependente da ação da RNA polimerase II, denomina-se reparo acoplado à transcrição (TCR) (*Transcription Coupled Repair*) e assegura um rápido reparo dos genes ativos, sendo que o reparo do genoma global (GGR) (*Global Genome Repair*), independente da RNA polimerase II, é capaz de remover lesões localizadas em qualquer região do genoma celular (Bohr *et al.*, 1985; Mellon *et al.*, 1986; Costa *et al.*, 2003). Em geral, lesões contidas no genoma global ou na fita não transcrita são removidas pelo GGR, enquanto lesões contidas na fita transcrita de um gene ativo são reparadas pelo TCR.

Em GGR, o principal complexo de reconhecimento dos danos no DNA ocorre por meio das proteínas XPC/HR23B/CEN2 (grupo XP de complementação

C/Rad23 homólogo B/Centrin-2) (Sugasawa *et al.*, 2008). HR23B e CEN2 são proteínas acessórias que aumentam a afinidade e especificidade da ligação de XPC a hélice distorcida do DNA. Além disso, a afinidade de ligação do DNA com XPC geralmente correlaciona-se com o grau de distorção helicoidal (Sugasawa *et al.*, 2010). Por exemplo, XPC tem baixa afinidade a lesões que são causadas por pequenas distorções, induzidas pelos raios ultravioletas por exemplo. Assim, um auxiliar de reconhecimento aos danos é o complexo denominado DNA danificado por UV (UV-DDB), a qual consiste de duas subunidades DDB1 e XPE (também conhecido como DDB2), que inicialmente detecta este tipo de alteração. A ligação de UV-DDB ao DNA danificado induz um aumento na distorção da hélice (ou seja, a flexão do DNA), a qual posteriormente facilita o recrutamento do complexo XPC para o local danificado (Sugasawa *et al.*, 2010). Em contraste, o reconhecimento dos danos em TCR é iniciado quando a RNA polimerase II encontra um local de dano no DNA (Fousteri & Mullenders; 2008). Na sequência, duas proteínas específicas do TCR deslocam a RNA polimerase II parada para permitir que as proteínas NER acessem à lesão (Hanawalt & Spivak, 2008). Após o reconhecimento dos danos, tanto GGR e TCR prosseguem nos núcleos comuns das reações do NER. Inicialmente, tanto o complexo XPC em GGR e CSB e CSA no TCR recrutam outras proteínas para o sítio lesado. Dentre estas proteínas estão duas TFIIH com atividades de ATP helicase dependente (XPB e XPD), que orquestram o desenrolamento assimétrico da hélice do DNA para formar uma bolha de aproximadamente 30 nucleotídeos que envolvem a lesão. O desenrolamento permite o acesso de XPA à região danificada, o que proporciona um segundo nível de reconhecimento do dano, além de garantir que o dano no DNA seja reparado por excisão. A ligação de XPA é acompanhada pela ligação da proteína de replicação A (RPA), o qual permite a completa extensão e subsequente estabilização do complexo pré-incisão. No passo subsequente, duas endonucleases específicas de estrutura XPG (XPF e ERCC1) clivam o DNA nas posições 3' e 5' para o dano, respectivamente, conduzindo a excisão do oligonucleótido contendo lesão de cerca de 30 nucleotídeos. Finalmente as DNA

polimerases δ ou ϵ utilizam a cadeia intacta como molde para ressintetizar o intervalo resultante. A fita reparada é então selada pela DNA ligase, completando assim o processo de NER (Li, 2008).

O MMR desempenha um papel essencial no reparo pós-replicação das bases que escapam da atividade de revisão e replicação das DNA polimerases. Além de bases incompatíveis, proteínas de MMR também realizam inserções/deleções após a síntese incorreta da DNA polimerase durante a replicação de sequências repetidas do DNA. Células deficientes exibem um fenótipo mutante, o qual é caracterizado por instabilidade de microssatélites e uma frequência de mutação bastante elevada. Mais importante ainda é que mutações germinativas nos genes associados ao MMR predisõem a uma variedade de cânceres, incluindo o câncer de cólon hereditário não-poliposo, também conhecido como síndrome de Lynch (Peltomaki, 2001). A via de MMR pode ser dividida em três passos principais: uma etapa de reconhecimento das bases, uma etapa de excisão onde o erro está contido, resultando em uma lacuna, e a etapa de síntese e reparação, onde a lacuna é preenchida pela ressíntese do DNA. O processo de MMR é realizado por um complexo de proteínas, incluindo MutS, MutL, MLH1, entre outras (Modrich, 2006).

A quebra na dupla fita do DNA é um dos mais perigosos tipos de dano do DNA. Um único dano é muitas vezes suficiente para induzir a morte celular e o reparo impreciso pode levar a deleções ou aberrações cromossômicas, facilitando o desenvolvimento do câncer ou de síndromes de instabilidade genômica. Assim, o DSBR é crítico para a manutenção da integridade do genoma e a sobrevivência celular (Van Gent *et al.*, 2011; Khanna & Jackson, 2001). Os dois mecanismos associados a DSBR são HR e NHEJ. Estes dois sistemas de reparação homóloga diferem na exigência de um modelo de DNA e na fidelidade do reparo. HR é em grande parte um mecanismo isento de erros, uma vez que utiliza a informação genética contida na cromátide irmã intacta como um modelo. Em contraste, NHEJ normalmente é passível de erro e envolve a eliminação de DSB pela ligação direta das extremidades abertas. NHEJ é fundamentada para ser a via predominante em

células de mamíferos que operam em todas as fases do ciclo celular, enquanto o HR é restrito às fases finais de S e G2 do ciclo celular.

O HR pode ser conceitualmente dividido em três fases: pré-sinapse, sinapse e pós-sinapse. Na pré-sinapse, as extremidades de DNA que cercam as DSB são processadas da porção 5' para a 3', gerando moléculas com caudas 3' de fitas simples. O complexo MRN (Mre11 - RAD50 - Nbs1), juntamente com CtIP (RBBP8), é responsável pela eliminação da porção 5', criando uma fita com duas porções 3'. O segundo passo é realizado pela ação combinada da helicase BLM (síndrome de Bloom, RecQ helicase) e Exo1 exonuclease (Nimonkar, 2008). Após a ressecção final, caudas de fita simples de DNA estão ligadas por RPA para remover estruturas secundárias perturbadoras, que poderiam obrigatoriamente de alguma forma, obstruir a ligação de Rad51 recombinase. RPA é posteriormente substituído por RAD51 em conjunto com várias proteínas, incluindo RAD52, BRCA2 e um grupo de proteínas parálogas a RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3) (Forget, 2010). RAD51, também descrita como filamento de nucleoproteína RAD51, executa a busca da sequência homóloga de DNA que é o centro da HR. Em seguida, a síntese do DNA, a partir da porção 3', é realizada pela DNA polimerase com ligação pela DNA ligase I para se obter uma estrutura intermédia de junção de quatro vias conhecidas como junção Holiday. Esta recombinação intermediária é resolvida de uma das três maneiras: dissolução mediada pelo complexo BLM-TopIII α , por clivagem simétrica de GEN1/Yen1 ou SIX1/SIX4, ou clivagem assimétrica de estrutura específica de endonuclease Mus81/Eme1, resultando na correção livre de erros de DSB (Rass *et al.*, 2008; Seki *et al.*, 2006).

O mecanismo molecular da NHEJ é mediado por um número relativamente pequeno de fatores essenciais que são sequencialmente recrutados para o local da DSB. O passo inicial no processo implica no reconhecimento e ligação do complexo heterodímero Ku70/Ku80 (complexo Ku). Em humanos Ku70 é representado pela proteína XRCC6 e Ku80 por XRCC5. Estruturalmente Ku adota a forma de anel que circunda completamente a dupla hélice do DNA (Walker,

2001). Após a ligação ao DNA, o complexo Ku recruta a proteína DNA-PK, a qual exibe a atividade de quinase. O recrutamento da DNA-PK induz uma translocação para dentro de Ku ao longo do DNA, que permite a DNA-PK ter um contato as porções terminais do DNA (Yoo, 1999). Mais importante ainda, a ligação de DNA-PK as extremidades opostas do DSB promove a sinapse ou amarração das duas moléculas de DNA e resulta na sua autofosforilação, fazendo com que as porções terminais de DNA se tornem acessíveis (De Fazio *et al.*, 2002). Como a maioria dos processos de reparação do DNA, as extremidades do DNA podem exigir a modificação antes da ligação. Por exemplo, as porções terminais do DNA que contêm saliências em cadeia simples podem ser ligadas por DNA polimerases. A ressíntese da falta de nucleotídeos durante NHEJ tem sido associada a dois membros da família X da DNA polimerase Pol μ e Pol λ (Lieber *et al.*, 2007). Alternativamente, outros candidatos que também podem participar de processo final deste sistema de reparo do DNA incluem várias das enzimas associadas com BER, tais como APE1, Tdp1 e PNKP (Chappel *et al.*, 2002), bem como duas exonucleases funcionais, a Exo1 e a WRN. Depois do processamento apropriado, a DNA ligase IV, em conjunto com o seu parceiro de ligação XRCC4, promovem a ligação das fitas do DNA. Um fator adicional, XLF (fator de XRCC4) interage com o complexo de DNA ligase IV e XRCC4 para promover a ligação do DNA (Ahnesorg *et al.*, 2006).

Diante da complexidade destes processos descritos, pode-se perceber o significado biológico dos mecanismos de reparo do DNA e a sua importância, pelo fato da ocorrência de alguma falha neste processo, poder contribuir para possíveis alterações que vão desde as malformações congênitas, até o início e a progressão de neoplasias. A seguir serão descritos os polimorfismos genéticos de genes do reparo do DNA, analisados neste estudo, bem como a participação desses genes nos diferentes sistemas de reparo do genoma.

2.5.1 ADPRT

O gene *ADPRT* (*adenosine diphosphate polyribosyl transferase*) está localizado no cromossomo 1q41-42. Este gene é responsável por codificar a enzima poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1), que apresenta um papel importante na remodelação da cromatina, participando de maneira fundamental no sistema de BER. PARP-1 é uma proteína nuclear que funciona como um sensor para erros na estrutura do DNA (Lockett *et al.*, 2004). Especificamente, PARP-1 liga-se a região de erro via seu domínio N-terminal, promovendo o relaxamento da estrutura da cromatina e o recrutando de outras proteínas do sistema de reparo, incluindo XRCC1 e DNA-PK (Caldecott *et al.*, 1996a; El-Khamisy *et al.*, 2003). Desta maneira, PARP-1 é essencial para manutenção da integridade do genoma e a capacidade de interagir com várias proteínas do sistema de reparo do DNA o faz participar não apenas do BER, mas também do SSBR e DSBR. Em adição, PARP-1 é envolvido com outros eventos celulares e moleculares como modulação da expressão gênica, indução de apoptose e manutenção do telômero. Fortes evidências demonstram que a deficiência de PARP-1 resulta em instabilidade genômica, falha na indução da apoptose e alterações na expressão gênica, contribuindo para a tumorigênese (Masutani *et al.*, 2005; Shiokawa *et al.*, 2005; Bieche *et al.*, 1996).

Inúmeros polimorfismos foram identificados ao longo dos mais de 47 kb de extensão do gene, mas o polimorfismo rs1136410, localizado no códon 762 do exon 17, que resulta na transição de um T para um C, alterando o aminoácido valina para uma alanina (Val762Ala), é o mais extensivamente estudado. Este polimorfismo reduz a atividade de PARP-1 em uma dose-dependente, dificultando o reparo do DNA e aumentando a susceptibilidade a agentes mutagênicos (Locke *et al.*, 2004; Zaremba *et al.*, 2009). Embora inúmeros estudos tenham demonstrado uma significativa associação deste polimorfismo com a suscetibilidade a cânceres em diferentes órgãos (Smith *et al.*, 2008; Miao *et al.*, 2006; Roszak *et al.*, 2013;), uma recente meta-análise revelou uma significativa associação com grupos étnicos específicos (asiáticos principalmente) e com

alguns tipos de cânceres como os de estômago, cérvix, pulmão e gliomas (Qiu *et al.*, 2014). Além de uma forte associação com o câncer, o polimorfismo rs1136410 é também significativamente associado com doença de Alzheimer (Liu *et al.*, 2010) e alterações cognitivas decorrentes de defeitos no hipocampo (Nho *et al.*, 2013).

2.5.2 OGG1

O gene *OGG1* (*oxaguanine glycosylase 1*) está localizado no cromossomo 3p25 e é responsável por codificar a proteína que recebe o mesmo nome. A lesão mais comumente associada ao estresse oxidativo é a formação da 8-oxo-deoxiguanosina (8-oxo-dG), que resulta na transversão de um GC para um TA (Cheng *et al.*, 1992; Hazra *et al.*, 2001). A proteína OGG1, que apresenta uma atividade de DNA glicosilase e liase, é a principal responsável por reparar as transversões induzidas pelo 8-oxo-dG, desenvolvendo então um papel importante no BER (Gushima *et al.*, 2009; Boiteux *et al.*, 2000).

Desde as primeiras descrições que a presença do polimorfismo rs1052133 no gene *OGG1* resulta em uma enzima com menor atividade reparadora (Ito *et al.*, 2002; Yamane *et al.*, 2004), inúmeros estudos se propuseram a determinar o papel deste polimorfismo em doenças multifatoriais, particularmente no câncer. Este polimorfismo resulta em uma transversão de um C para um G no exon 7 do gene, promovendo a substituição de uma serina por uma cisteína na posição 326 da proteína (Boiteux & Radicella, 2000). Indivíduos homozigóticos para a variante cisteína apresentam maior instabilidade cromossômica, menores índices de reparação da 8-oxo-dG e grande sensibilidade a inativação da enzima por parte de agentes oxidativos (Bravard *et al.*, 2009). Assim, indivíduos com este polimorfismo quando sujeitos a condições inflamatórias e de grande estresse oxidativo não apresentam uma capacidade normal de reparo, aumentando o risco de desenvolvimento neoplásico (Boiteux & Radicella, 1999; Goode *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Na verdade, a presença do alelo G foi associada com risco aumentado de cânceres de esôfago, pulmão e coloretal (Zhang *et al.*, 2013; Przybylowska *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2014). Além da associação com câncer, este

polimorfismo foi recentemente associado com a catarata (Yi *et al.*, 2012), doença de Huntington (Berger *et al.*, 2013) e doença de Parkinson (Cornetta *et al.*, 2013).

2.5.3 MLH1

O gene *MLH1* (*mutL homologue 1*) localiza-se no cromossomo 3p22.3 e consiste de 19 exons que codificam uma proteína com 765 aminoácidos (An *et al.*, 2008). A proteína MLH1 é essencial para o MMR e disfunções de proteínas associadas a este sistema de reparo do DNA causam instabilidade genômica, principalmente em regiões de microssatélites e sequências repetidas em tandem curtas (Thibodeau *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 1999; Fleisher *et al.*, 1999). Interessantemente, alguns estudos demonstram que MLH1 interage não apenas com proteínas relacionadas ao MMR, mas também com proteínas envolvidas no ciclo celular, apoptose e sinalização celular (Stojic *et al.*, 2004; Cejka *et al.*, 2003;; Cannavo *et al.*, 2007). Mutações em MLH1 têm sido relatadas em cânceres de origem familiar (He *et al.*, 2013) e polimorfismos genéticos vêm sendo apontados como um fator de risco para o desenvolvimento de cânceres espontâneos, particularmente o polimorfismo rs1800734 localizado na região promotora de *MLH1* (-93G>A) (He *et al.*, 2013). Por se localizar em uma região promotora, a presença do polimorfismo altera a capacidade de ligação de fatores de transcrição, diminuindo a transcrição do gene e conseqüentemente a eficácia do MMR (Ito *et al.*, 1999).

O polimorfismo rs1800734 foi associado a vários tipos de câncer, principalmente o coloretal (Wang *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2006; Van Roon *et al.*, 2010; Ian *et al.*, 2014), próstata (Tanaka *et al.*, 2009), mama (Smith *et al.*, 2008; Naqvi *et al.*, 2008;), gástrico (Capela *et al.*, 2008) e cabeça e pescoço (Czernincki *et al.*, 2009; Gonzales *et al.*, 2011).

2.5.4 APEX1

O gene *APEX1* (*apurinic apyrimidic endonuclease 1*), localizado no cromossomo 14q11.2, consiste de 5 exons distribuídos em 2,21 kb e é

responsável por codificar a enzima apurínica/apirimidínica endonuclease 1 (APE1). Esta enzima primariamente reconhece os sítios apurínicos ou apirimídicos gerados pelas DNA glicosilases e remove o core remanescente do nucleotídeo incorreto para que a síntese de um novo nucleotídeo possa ocorrer (Moore *et al.*, 2013; Timofeyeva *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2000). APE1 também interage com o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um co-fator da DNA polimerase δ , e com a endonuclease FEN1, ressaltando um papel fundamental para o sistema de BER (Lucsford *et al.*, 2013). Interessantemente alguns estudos relatam a interação de APE1 e p53, sugerindo um papel de APE1 no controle do ciclo celular e da apoptose (Bobola, 2001; Tell *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2011).

Embora vários polimorfismos tenham sido descritos em *APEX1* (Zhou *et al.*, 2011), o polimorfismo rs1130409, uma transição de uma T para G na posição 1349 do exon 5, que resulta na substituição de um aminoácido aspartato (ácido aspártico) por uma glutamina na posição 148 (Asp148Glu), tem sido um dos mais extensivamente investigados (Hu *et al.*, 2013). Estudos funcionais sugerem que a presença do alelo variante G interfere na capacidade de endonuclease da enzima APE1, bem como altera sua habilidade de interagir com outras proteínas associadas ao sistema BER, reduzindo significativamente a capacidade de reparo (Hadi *et al.*, 2000, Au *et al.*, 2003). Este polimorfismo foi associado com diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de cabeça e pescoço (Mahjabeen *et al.*, 2013), osteossarcomas (Yang *et al.*, 2010), câncer pancreático (Jiang *et al.*, 2006), ovariano, gastresofagiano (Al-Attar *et al.*, 2010) e recentemente com retinoblastoma (Sudhakar *et al.*, 2014). A associação com câncer de pulmão foi registrada em diversos estudos (Tell *et al.*, 2005; De Ruyck *et al.*, 2007; Agachan *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013), e em uma meta-análise recente (Jin *et al.*, 2014).

2.5.5 XRCC3

O gene *XRCC3* (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3*) está localizado no cromossomo 14q32.3 e é responsável por

codificar a proteína XRCC3 envolvida no processo de reparo por HR, em que a fita complementar não danificada é utilizada como molde na substituição do fragmento lesado, preservando a integridade cromossômica (Yamada *et al.*, 2004). Especificamente a proteína XRCC3, que é um dos parálogos de RAD51, desempenha a função de estabilizar o pareamento da molécula de DNA alterada com a molécula de DNA intacta, por compartilhamento de homologia, e assim permitir a recuperação da informação genética (Jackson, 2002). A proteína XRCC3 é também requerida para a montagem do complexo proteico RAD51 (Manuguerra *et al.*, 2006). Células com mutações em *XRCC3* apresentam níveis reduzidos em até 25 vezes de reparo por HR (Pierce *et al.*, 1999) e altos níveis de aberrações cromossômicas e segregação cromossomal anormal na mitose (Griffin *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2004).

O polimorfismo rs861539, localizado no exon 7, resulta na transição de C para T (C18067T) e na substituição de uma treonina por uma metionina na posição 241 (Thr241Met) (Han *et al.*, 2006; Krupa *et al.*, 2010). Polimorfismos do gene *XRCC3* geram enzimas que não permitem a formação eficiente do complexo RAD51, gerando instabilidade genética e maior sensibilidade aos raios UV (Liu *et al.*, 1998, Winsey *et al.*, 2000). Vários estudos têm relacionado este polimorfismo com alguns tipos de câncer, como o de mama (Smith *et al.*, 2003), de pulmão (Jacobsen *et al.*, 2004; Manuguerra *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2013; Dhing *et al.*, 2013), coloretal (Krupa & Blasiak, 2004), de bexiga (Andrew *et al.*, 2008), cabeça e pescoço (Werbrouck *et al.*, 2008), melanomas (Winsey *et al.*, 2000) e leucemias (Yan *et al.*, 2014). Além disso, o polimorfismo rs861539 também tem sido recentemente estudado em outras doenças como nas doenças coronarianas (Yu *et al.*, 2014) e no lúpus eritematoso sistêmico (Chen *et al.*, 2014).

2.5.6 RAD51

O gene *RAD51* está localizado no cromossomo 15q15 e é responsável por codificar a proteína Rad51 conhecida por estar envolvida na reparação das quebras na dupla fita do DNA pelo mecanismo de HR. A proteína Rad51 pode

interagir com a proteína de ligação RPA e Rad52, emparelhando e transferindo o DNA (Cheng *et al.*, 2011). O complexo também envolve outras proteínas, particularmente BRCA1 e BRCA2, sendo fundamentais para a resposta celular aos danos no DNA (Vral *et al.*, 2011). O processo de HR tem como passo central a troca de informações entre as fitas de DNA (intacta e alterada) em regiões homólogas. As proteínas capazes de realizar estas reações enzimáticas são conhecidas como recombinases. Rad51, em eucariontes, e RecA, em procariontes, são exemplos de proteínas que possuem essa capacidade (Masson *et al.*, 2001) Essas duas enzimas guardam homologia estrutural e funcional, promovendo a busca por regiões homólogas do DNA, a invasão da fita simples na dupla fita homóloga e a hidrólise do ATP para compor, assim, a reação total em que ocorre a troca entre fitas de DNA (North *et al.*, 2013). Rad51 e RecA possuem regiões de ligação ao DNA e um domínio de ligação a ATP, sendo essa última a região em que reside a maior parte da homologia estrutural quando se alinha a proteína RecA de *E. coli* e Rad51 de humanos (Shinoraha *et al.*, 1993). Em Rad51, essa região corresponde a C-terminal, ao passo que, em RecA, corresponde a N-terminal. Rad51 possui uma região extra N-terminal, ao passo que RecA possui uma região C-terminal extra. Estas regiões compreendem o domínio de ligação ao DNA (Kurumizaka *et al.*, 1996).

Recentemente foi descrito um papel adicional de Rad51 na manutenção do genoma mitocondrial de células humanas. Na mitocôndria, Rad51 teria o papel de regular o número de cópias de DNA mitocondrial principalmente após o estresse oxidativo (Sage *et al.*, 2010). Múltiplas variantes de transcrição foram encontradas para este gene e associadas com um risco aumentado de desenvolver câncer de mama (Antoniou *et al.*, 2007). Os níveis aumentados de expressão de Rad51 foram identificados no carcinoma mamário, indicando que a instabilidade genômica desempenha um papel importante na carcinogênese deste tipo de tumor (Thacker, 2005). O polimorfismo rs1801321, localizado na região promotora do gene RAD51, na posição -60 5' UTR, resulta na substituição de um G por um T (-60G>T) e altera a atividade transcricional do gene (Hasselbach *et al.*, 2005). A

presença do alelo variante T foi correlacionado com um risco aumentado para câncer de mama (Sehl *et al.*, 2009, Vral *et al.*, 2011), de cabeça e pescoço (Gresner *et al.*, 2012) e ovário (Osório *et al.*, 2011).

2.5.7 XRCC1

O gene *XRCC1* (*X-ray cross complementing defective repair in Chinese hamster cells1*), mapeado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2), codifica a proteína nuclear com 633 aminoácidos que recebe o mesmo nome do gene e está envolvida no sistema de reparo por BER (Thompson *et al.*, 1989). Interessantemente, a proteína XRCC1 não possui atividade enzimática propriamente dita e aparentemente age como um fator nuclear fundamental no processo de BER pelo recrutamento de diferentes componentes do reparo para o local da base lesada (Han *et al.*, 2004). Neste caso o complexo interage com o DNA e remove alterações de bases únicas que tenham sido metiladas, que tenham perdido um grupamento amina, oxidadas ou reduzidas, retificando assim a fita única (Hu *et al.*, 2013, Hung *et al.*, 2005, Tudek *et al.*, 2007). A proteína XRCC1 atua como facilitadora e coordenadora do BER, sendo imprescindível na formação do complexo com as demais proteínas (Caldecott, 2003; Jelonek, 2010). XRCC1 também tem o papel de interagir com várias outras enzimas participantes do BER, como a DNA ligase III, a DNA polimerase β e a APE, e parece contribuir para a eficiência do processo, bem como para a estabilidade genômica após a ocorrência da lesão (Saadat & Ansari-Lari, 2008; Smith *et al.*, 2008)

Sugere-se que polimorfismos no gene *XRCC1*, que causam mudanças de aminoácidos, possam impedir a interação de XRCC1 com outras proteínas e conseqüentemente alterar a atividade do sistema de reparo de DNA por BER (Saadat & Ansari-Lari, 2008). Este estudo analisou 4 polimorfismos contidos no gene *XRCC1*. O polimorfismo rs25487, localizado no códon 399 do exon 10, é uma transição de um G para um A, resultando na substituição de um resíduo de arginina por um de glutamina na posição 299 da cadeia proteica (Arg399Gln). O polimorfismo rs25489 é localizado no códon 280 do exon 9 e resulta na transição

de um G para um A e na substituição de um resíduo de arginina por um de histidina (Arg280His). O rs1799782, localizado no códon 194 do exon 6, é uma transição de um C para um T e resulta em substituição de um resíduo de arginina por um de triptofano (Arg194Trp). O polimorfismo rs3213245 corresponde a uma substituição de um C pelo variante T na região promotora 5' UTR do gene *XRCC1*. Este polimorfismo é considerado funcional, visto que resulta em uma transcrição reduzida do gene (Ginsberg *et al.*, 2011).

Os polimorfismos rs1799782 e rs25487 são os mais frequentemente investigados (Saadat & Ansari-Lari, 2008; Wang *et al.*, 2008; Chacko *et al.*, 2005) e estão associados a um aumento no risco de câncer, como os de laringe (Hung *et al.*, 2005), de bexiga (Goode *et al.*, 2002), de cabeça e pescoço (Tudek, 2007), de mama (Goode *et al.*, 2002, Hung *et al.*, 2005), de pulmão (Hung *et al.*, 2005), leucemias (Tudek 2007) e melanomas (Han *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2006). Já foram estudados na esclerose lateral amiotrófica também (Rulten *et al.*, 2014).

2.5.8 ERCC2

O gene *ERCC2* (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency group 2*), também conhecido como *XPD* (*Xeroderma Pigmentosum Group D*), é mapeado para o cromossomo 19q13.3. Este gene é responsável por codificar uma enzima com atividade de DNA helicase, dependente de ATP e envolvida no mecanismo de reparo por NER (Sung *et al.*, 1993). O papel desta enzima não se limita ao processo de reparo do DNA, visto que atua no desenovelamento da dupla hélice do DNA nas regiões transcricionalmente ativas do DNA e durante o processo de duplicação do DNA (Caggana *et al.*, 2001). Além disso, as proteínas ERCC2 e p53 podem interagir uma com a outra para modular a apoptose (Clarkson & Wood, 2005). A via de reparo por NER é a principal via celular para a remoção de lesões volumosas do DNA, em particular, foto produtos induzidos por UV, adutos, ligações cruzadas (*cross-links*) e produtos resultados do estresse oxidativo (De Boer & Hoeijmakers, 2000). Mutações em *ERCC2* foram

associadas com o xeroderma pigmentoso, tricotiodistrofia e síndrome de Cockayne (Liang *et al.*, 2003; Lehmann, 2001).

Este estudo analisou 2 polimorfismos contidos no gene ERCC2. O polimorfismo rs13181, localizado no códon 312 do exon 10, que resulta na transcrição de um G para A, alterando o ácido aspártico para uma aspargina (Asp312As) e o polimorfismo rs1799793 localizado no códon 751 do exon 23, que resulta na transcrição de A para C, alterando o aminoácido lisina para glutamina (Lys751Gln). Ambos os polimorfismos resultam em uma enzima com menor atividade, promovendo erros nos sistemas dependentes de ERCC2, especialmente o sistema de reparo (Liu *et al.*, 2007). De acordo com estudos epidemiológicos, estes polimorfismos estão relacionados com o risco aumentado de adenocarcinoma esofágico (Tse *et al.*, 2008), gástrico (Xue *et al.*, 2012) e de bexiga (Wu *et al.*, 2006). Um risco aumentado para o câncer de pele e o câncer de mama tem sido frequentemente observado em pacientes com a presença dos alelos variantes (Han *et al.*, 2005; Kertat *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2014).

2.6 Genes do reparo do DNA e FL/PNS

Até o momento poucos estudos testaram a hipótese que alterações em genes do sistema de reparo do DNA podem ter um papel causal na etiologia das FL/PNS. Um dos únicos trabalhos com o objetivo de investigar a relação entre polimorfismos dos genes de reparo de DNA e o risco de FL/PNS foi realizado por Olshan *et al.* (2005). Eles avaliaram em um estudo caso-controle (125 pacientes com FL/PNS e 350 controles) 5 genes do sistema de reparo do DNA, incluindo *XRCC1*, *APE1*, *XRCC3*, *OGG1* e *ERCC2* e 6 polimorfismos (rs25487, rs1130409, rs861539, rs1052133, rs13181 e rs1799793). Este estudo demonstrou que indivíduos homocigotos para o alelo variante do polimorfismo rs1052133 no gene *OGG1* (GG, Cisteína/Cisteína) apresentam um risco menor de desenvolvimento de FL/PNS (OR: 0,22,95% CI: 0,06-0,78). Contudo, é importante destacar que apenas 3 pacientes do grupo controle foram homocigotos para o alelo G, levantando dúvidas quanto a consistência do resultado. Em adição, indivíduos que

carregam duplamente o alelo variante (homozigotos) apresentam menores índices de reparo e maior instabilidade cromossômica (Bravard *et al.*, 2009). Nenhuma outra associação foi observada, mas como salientado pelos próprios autores do manuscrito, o poder do estudo foi pequeno com o tamanho amostral (Olshan *et al.*, 2005).

Em um estudo com células multipotentes de polpa dental de pacientes com FL/PNS, Kobayashi e colaboradores (2013) demonstraram uma desregulação na expressão de genes associados com quebra na dupla fita do DNA, particularmente *BRCA1* e *RAD51*. Interessantemente, estes autores também demonstraram que ambos os genes são expressos nos processos embrionários relacionados ao desenvolvimento orofacial, sugerindo que o exato funcionamento destes genes é fundamental para a morfogênese do lábio e palato (Kobayashi *et al.*, 2013).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Descrever as características clínicas, demográficas e de risco de um grupo de indivíduos com FL/PNS da região oeste do Paraná.

3.2 Determinar a associação de polimorfismos contidos em genes do reparo do DNA (rs1136410 no gene *ADPRT*, rs1052133 no gene *OGG1*, rs1800734 no gene *MLH1*, rs1130409 no gene *APEX1*, rs861539 no gene *XRCC3* rs1801321 no gene *RAD51*, rs25487, rs25489, rs3213245 e rs1799782 no gene *XRCC1* e rs13181 e rs1799793 no gene *ERCC2*) com a suscetibilidade para o desenvolvimento de FL/PNS.

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 e 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. Como foi um estudo desenvolvido junto a crianças e adolescentes foi obtido não só a concordância dos mesmos, mas também e fundamentalmente, o consentimento dos seus responsáveis legais. Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOP-UNICAMP (protocolo 071/2012; Anexo1).

4.2 Desenho do estudo

Este estudo foi dividido em duas partes. Na primeira parte foi realizado um estudo epidemiológico, no qual 194 pacientes com FL/PNS e seus pais foram avaliados por meio de um questionário com o objetivo de caracterizar a população afetada por FL/PNS atendida no centro de referência da região oeste do estado do Paraná. Como o objetivo era caracterizar apenas essa região, o questionário foi aplicado apenas nesse grupo.

Na segunda parte do estudo, amostras de saliva de 223 pacientes com FL/PNS e seus genitores, assistidos em 4 centros de atendimento a FL/P, sendo estes localizados em Alfenas-MG, Salvador-BA, Cascavel-PR e João Pessoa-PB, foram analisadas quanto a frequência alélica e genotípica de polimorfismos localizados em genes do sistema de reparo do DNA.

4.3 Critérios de inclusão

Para o estudo epidemiológico foram incluídos todos os pacientes com FL/PNS atendidos, entre agosto de 2012 e dezembro de 2013, na Associação Portadores de Fissura Labial localizada na cidade de Cascavel, Paraná

(APOFILAB), no qual os pais concordaram em responder ao questionário de coleta de dados. Não foram incluídos pacientes que apresentavam a forma síndrômica de FL/P. Para o estudo dos polimorfismos genéticos, apenas pacientes com FL±P NS foram incluídos, sendo excluídas as FPs, uma vez que a mesma, provavelmente, apresenta um mecanismo de origem diferente da FL±P.

4.4. Grupos de estudo

4.4.1 Estudo epidemiológico

Esta parte do estudo foi realizada apenas na APOFILAB, uma associação que serve de referência para os indivíduos com fissuras orofaciais de toda a região Oeste do Paraná, envolvendo uma população de aproximadamente 400.000 habitantes. Para determinar o perfil dos indivíduos com FL/PNS desta região, 194 pais de indivíduos com FL/PNS foram entrevistados por meio de um questionário padrão (Anexo2), que continha questões relacionadas aos pacientes com fissura e seus genitores, visando levantar dados referentes aos aspectos ambientais e genéticos (detalhes abaixo). Destes 194 participantes, obteve-se 74 trios os quais também foram utilizados para o estudo genético.

4.4.2 Estudo genético

Tendo em vista a dificuldade e o tempo necessário de coletas para conseguir o número adequado de trios, visando a análise de polimorfismos, apenas na região oeste do Paraná, também foi necessário utilizar amostras de DNA previamente coletadas, de outros 3 Centros de atendimento de pacientes com fissuras orofaciais: o Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas (Centro Pró-Sorriso-Centrinho), localizado em Alfenas, Minas Gerais, o Centrinho do Hospital Santo Antônio das Obras Assistenciais Irmã Dulce, Salvador, Bahia, e do Hospital Universitário Alcides Carneiro, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. Em todos os 4 Centros, amostras de DNA dos trios (pai e mãe normal e filho afetado por FL/PNS) foram disponibilizados, totalizando 223 trios para essa parte do estudo (74 da

APOFILAB, 93 do Centro Pró-Sorriso, 22 do Centrinho do Hospital Santo Antônio das Obras Assistenciais Irmã Dulce e 34 do Hospital Universitário Alcides Carneiro).

4.5 Instrumento para coleta de dados (Questionário)

Um questionário com questões estruturadas e semi-estruturadas visando obter a caracterização da amostra foi utilizado como instrumento de pesquisa. (Anexo 2). Priorizou-se que os mesmos fossem respondidos pelos dois genitores, mas quando não era possível, apenas um dos genitores respondia. Diversos dados eram relacionados às condições ocupacionais e hábitos durante o período gestacional por isso da necessidade de ao menos um dos genitores. As variáveis analisadas em relação aos pacientes com FL/PNS foram: gênero, idade, cor de pele/raça, tipo de fissura e sua extensão, presença de alterações sistêmicas associadas e tratamento cirúrgico e odontológico. Em relação à idade dos pacientes no momento da coleta da informação, os mesmos foram divididos em 4 grupos: 0-2 anos, sendo considerados lactentes; 2-12 anos, primeira infância; 13-20 anos, segunda infância e adolescência; e acima de 20 anos, jovens e adultos. A variável cor de pele/raça foi dividida em 3 grupos, relacionados com a possível ancestralidade, sendo considerado leucoderma, para os indivíduos caucasianos, feoderma para os de origem africana e xantoderma para os de origem asiática. As FL/PNS foram classificadas segundo Spina e colaboradores (1972). Em relação à saúde geral do paciente com FL/PNS, investigou-se a presença de alterações sistêmicas que foram divididas em alterações otorrinolaringológicas, alterações respiratórias, alterações cardíacas, alterações dermatológicas, alterações gastrointestinais, alterações neurológicas, alterações oftalmológicas, alterações musculoesqueléticas e alterações faciais. Considerou-se no item tratamento cirúrgico a realização ou não da cirurgia reparadora do defeito e o período em que o procedimento foi realizado. O período que ocorreu a cirurgia foi dividido em 0-6 meses, 7-12 meses, 13-24 meses e 25 meses até 11 anos de idade. Como todos os pacientes deste Centro recebem atendimento odontológico, a variável neste

item foi estar ou não em atendimento odontológico durante o momento da entrevista.

Em relação aos pais, este estudo investigou os hábitos no período preconcepção (um ano antes da gestação) e durante a gestação. Os itens investigados foram: idade materna e paterna no momento da concepção, hábitos maternos e paternos de tabagismo, tabagismo passivo, consumo de bebidas alcoólicas, uso de drogas ilícitas e contato com substâncias químicas. Levando em consideração apenas os hábitos maternos, o estudo considerou o uso de medicamentos e o uso de suplementação vitamínica. Antecedentes gestacionais, presença de casamento consanguíneo, história de fissura orofacial na família e história de câncer na família também foram investigados. Tabagismo passivo foi considerado quando a mãe não apresentava o hábito, mas morava com alguém que apresentava o hábito e/ou era exposta a fumaça do cigarro constantemente. O mesmo raciocínio é verdadeiro para contato indireto com agrotóxicos. Neste caso foram considerados positivos os indivíduos que trabalhavam como lavradores e no local de trabalho havia exposição indireta a agrotóxicos ou moravam próximos a lugares com pulverizações constantes de agrotóxico. Contato direto com tintas, solventes, cal, cimento, combustíveis e substâncias de laboratório, foram considerados como outras substâncias. Mães que fizeram uso de medicamentos como antibióticos, anticonvulsivantes ou corticosteróides durante o primeiro trimestre de gestação foram classificadas como sim para este item. Suplementação vitamínica no período pré-concepcional ou durante o primeiro trimestre de gestação foram classificadas como sim, enquanto que mães que fizeram uso após o primeiro trimestre de gestação ou não fizeram uso durante toda a gestação foram classificadas como não.

4.6 Coleta do material genético para Análise dos Polimorfismos

As amostras de células bucais foram coletadas por meio de um 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 5 ml de uma solução 66% alcoólica contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl e 7 mM EDTA e armazenado em ambiente refrigerado e encaminhados ao Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, onde foram realizados os demais procedimentos do estudo.

4.7 Isolamentos do DNA

A cada tubo foi adicionada água destilada e deionizada autoclavada q.s.p. 15 ml. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado 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 ressuspendido em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2 g de proteinase K (Invitrogen, USA) e incubado a 50°C em movimento contínuo semicircular. Após 16 h de incubação, foram adicionados 500 μ l de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 12.000 g a 4°C. O precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, centrifugado (12.000 g por 5 min), seco e ressuspendido em tampão Tris-EDTA (TE Buffer). A concentração e pureza das amostras foram determinadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm.

4.8 Seleções dos polimorfismos genéticos

Os polimorfismos em genes do reparo do DNA foram selecionados levando em consideração: 1) estarem relacionados a um efeito funcional na proteína; 2) apresentarem distribuição diferencial dos alelos em diferentes populações (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) e 3) não existirem estudos em FL/PNS envolvendo a população brasileira. Além disso, foram selecionados genes que representam diferentes mecanismos de reparo ao DNA. As características gerais de cada polimorfismo estão descritas na Tabela 1.

4.9 Genotipagem pelo método de discriminação alélica com sondas fluorescentes

As reações de genotipagem foram realizadas utilizando o sistema de discriminação alélica com sondas fluorescentes. Primers e sondas de todos os polimorfismos foram obtidos da *Applied Biosystems* (USA). A análise foi realizada no equipamento Step OnePlus (*Applied Biosystems*, USA), através de uma reação de 8 μ l contendo 4 μ l de 2x *Genotyping Master Mix*, 0,2 μ l da mistura de primers e sondas, e 2 ng DNA, os quais foram diluídos em 3,8 μ l 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 1. Características dos polimorfismos genéticos dos genes de reparo do DNA incluídos neste estudo.

Polimorfismo	Gene	Cromossomo	Localização	Alelos	MAF
rs1136410	ADPRT	1	226555302	c/T	0,244
rs1052133	OGG1	3	9798773	g/C	0,298
rs1800734	MLH1	3	37034946	a/G	0,314
rs1130409	APEX1	14	20925154	g/T	0,443
rs861539	XRCC3	14	104165753	t/C	0,251
rs1801321	RAD51	15	40987565	t/G	0,266
rs25487	XRCC1	19	44055726	a/G	0,263
rs25489	XRCC1	19	44056412	a/G	0,606
rs3213245	XRCC1	19	44079687	c/T	0,309
rs1799782	XRCC1	19	44057574	t/C	0,130
rs13181	ERCC2	19	45854919	g/T	0,237
rs1799793	ERCC2	19	45867259	a/G	0,194

MAF: Frequência do alelo menor. Alelo variante em letra minúscula. Fonte:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

4.10 Análises estatísticas

Para determinar a associação dos tipos de fissuras com características clínicas, demográficas e ambientais, tabelas de contingência e o teste qui-quadrado foram utilizados. Para a variável quantitativa (idade materna e paterna durante a concepção), o teste de variância (ANOVA) foi utilizado. A existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada como descrito por Rodriguez *et al.* (2009). O teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) foi realizado com o auxílio do software FBAT (Family based association test). Este teste tem o objetivo de verificar a associação genótipo-fenótipo a partir da transmissão diferencial dos alelos utilizando pais normais heterozigóticos e, pelo menos, um filho afetado. A análise dos haplótipos foi realizada com o software Haploview. Em todas as comparações, $p \leq 0,05$ foi indicativo de diferença estatisticamente significativa.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas, demográficas e ambientais de pacientes com FL/PNS do estudo epidemiológico

O grupo do estudo epidemiológico, foi composto por 194 pacientes com FL/PNS, 123 (63,4%) do gênero masculino e 71 (36,6%) do gênero feminino (Tabela 2). A variação de idade foi de 4 dias a 61 anos. A maior concentração foi de pacientes em fase escolar, uma vez que o Centro de referência para o tratamento dos pacientes com FL/PNS em Cascavel é também uma associação que ajuda no desempenho acadêmico dos pacientes. Desta forma, 29 indivíduos (14,9%) apresentavam de 0-2 anos, 95 (49%) de 2-12 anos, 51 (26,3%) de 13-20 anos e 19 (9,8%) com idade superior a 20 anos (Tabela 2). Quanto à cor da pele e possível raça, houve uma prevalência de indivíduos leucodermas, caucasianos, (n=173, 89,2%), seguido por feoderma, descendência africana (n=18, 9,3%) e xantoderma, descendência asiática (n=3, 1,5%) (Tabela 2). A maioria leucoderma pode ser justificada pela colonização da região ser composta por populações européias.

Concernente ao tipo de fissura, FL foi diagnosticada em 47 (24,2%) pacientes, 105 (54,1%) apresentaram FLP, 36 (18,6%) apresentaram FP e 6 (3,1%) pacientes foram diagnosticados com Fissura Submucosa FS (Tabela 2). A Tabela 3 ilustra a extensão das fissuras orofaciais identificadas neste estudo. Entre as FLs, 19 (40,4%) pacientes apresentaram FL unilateral completa (FLUC), 24 (51,1%) FL unilateral incompleta (FLUI), 3 (6,4%) FL bilateral completa (FLBC) e 1 (2,1%) paciente demonstrou FL bilateral incompleta. A maioria das FLPs foi unilateral completa (FLPUC, n=56, 53,4%), seguido por bilateral completa (FLPBC, n=31, 29,5%), unilateral incompleta (FLPUI, n=14, 13,8%) e bilateral incompleta (FLPBI, n=4, 3,8%). As FPs foram distribuídas de maneira simétrica, sendo que a forma completa envolveu 18 casos (FPC, 50%) e a incompleta envolveu outros 18 casos (FPI, 50%). No geral, o lado esquerdo da face foi mais afetado pelas fissuras que o lado direito. O envolvimento do lado esquerdo foi observado em 79

(69,9%) casos, sendo 31 casos associados às FLs e 48 às FLPs. Doze FLs e 22 FLPs acometeram o lado direito (Tabela 2).

Quarenta e oito (24,8%) pacientes apresentaram alterações sistêmicas associadas às fissuras orofaciais; sendo que 40 (83%) destes pacientes apresentaram apenas uma alteração associada, sendo essa a otorrinolaringológica, geralmente a mesma, e 8 apresentaram 2 ou mais alterações (Tabela 2). As alterações otorrinolaringológicas, com destaque para otites, amidalites e as alérgicas, e respiratórias, particularmente bronquite alérgica, foram as mais comuns entre os pacientes com FL/PNS. As alterações músculo-esqueléticas aconteceram em 11% dos pacientes com FL/PNS. Nosso estudo também identificou ainda outras alterações como as dermatológicas, que foram observadas em 4 (6,5%) casos, presença de refluxo gastroesofágico, referido por 3 (4,8%) pacientes, alterações neurológicas e oftalmológicas em 2 (3,2%) pacientes cada e alterações musculoesqueléticas e faciais que foram relatadas por 1 (1,6%) paciente cada. A Tabela 4 detalha todas as alterações identificadas neste estudo.

Em relação ao tratamento, 20 (10,3%) pacientes não passaram por nenhum tipo de procedimento cirúrgico, por apresentarem idade inferior ao recomendado para o primeiro procedimento reparador, e 174 (89,7%) já haviam realizado algum tipo de intervenção (Tabela 2). Para os pacientes tratados cirurgicamente, 107 (55,2%) foram submetidos à primeira intervenção até o 6º mês de vida, 28 (14,4%) do 7º-12º mês, 14 (7,2%) realizaram a intervenção no período entre o 13º e o 24º mês e 17 (8,8%) fizeram entre o 25º mês e os 11 anos de idade. Para 8 (4,1%) casos de FL/P NS não foi possível estabelecer o período preciso do tratamento cirúrgico realizado. A maioria dos pacientes realizaram 2 procedimentos cirúrgicos. De todos pacientes entrevistados, 135 (69,6%) estavam em tratamento odontológico no momento da pesquisa, e 59 (30,4%) dos pacientes já haviam terminado o tratamento odontológico (Tabela 2).

Tabela 2. Características dos pacientes com FL/PNS.

	Número de Casos	Porcentagem (%)
Gênero		
Masculino	123	63,4
Feminino	71	36,6
Faixa Etária		
0-2 anos	29	14,9
2-12 anos	95	49,0
13-20 anos	51	26,3
>20 anos	19	9,8
Cor da Pele		
Leucoderma	173	89,2
Feoderma	18	9,3
Melanoderma	3	1,5
Tipo de Fissura		
Fissura Labial(FL)	47	24,2
Fissura Lábio-Palatina(FL±P)	105	54,1
Fissura Palatina(FP)	36	18,6
Fissura Submucosa(FS)	6	3,1
Lateralidade das Fissuras		
Direita	34	30,1
Esquerda	79	69,9
Alterações Sistêmicas Associadas		
Não	146	75,2
Sim	48	24,8
Número de Alterações Sistêmicas		
Uma	40	83,0
Duas ou mais	8	17,0
Primeira Intervenção Cirúrgica		
Não fizeram	20	10,3
Até 6 meses	107	55,2
Entre 6-12 meses	28	14,4
Entre 13-24 meses	14	7,2
Entre 28 meses-11 anos	17	8,8
Não sabiam informar	8	4,1
Tratamento Odontológico		
Em Tratamento	135	69,6
Em Acompanhamento	59	30,4

Tabela 3. Extensão das FL/PNS nos pacientes deste estudo.

	Número de Casos	Porcentagem (%)
Fissura Labial		
FL Unilateral Completa	19	40,4
FL Unilateral Incompleta	24	51,1
FL Bilateral Completa	3	6,4
FL Bilateral Incompleta	1	2,1
Fissura Lábio-Palatina		
FLP Unilateral Completa	56	53,4
FLP Unilateral Incompleta	14	13,3
FLP Bilateral Completa	31	29,5
FLP Bilateral Incompleta	4	3,8
Fissura Palatina		
FP Completa	18	50,0
FP Incompleta	18	50,0

Tabela 4. Distribuição das alterações sistêmicas associadas aos pacientes com FL/PNS.

	Número de Casos	Porcentagem (%)
Alterações Otorrinolaringológicas		
Otite	10	16,1
Amidalite	8	12,9
Rinite alérgica	7	11,3
Sinusite	2	3,2
Faringite	1	1,6
Alterações Respiratórias		
Bronquite alérgica	13	21,0
Pneumonia de repetição	2	3,2
Alterações Cardíacas		
Sopro cardíaco benigno	6	9,7
Alterações Dermatológicas		
Dermatite alérgica	4	6,5
Alterações Gastrointestinais		
Refluxo	3	4,8
Alterações Neurológicas		
Convulsões	2	3,2
Alterações Oftálmicas		
Déficit Visual	2	3,2
Alterações Musculoesqueléticas		
Escoliose	1	1,6
Alterações Faciais		
Assimetria facial	1	1,6

5.2 Características dos genitores e antecedentes gestacionais

A idade média das mães durante a concepção era $25,6 \pm 5,8$ anos e a idade paterna $28,3 \pm 7,3$ anos. A grande maioria das mães e pais apresentava idade entre 21 e 30 anos no momento da concepção do filho com FL/PNS. Apenas duas (1%) mães e 10 (5,2%) pais apresentaram idade superior a 40 anos (Tabela 5). Destes, 2 casais, tanto o pai quanto a mãe com idade superior a 40 anos no momento da gestação.

Em relação aos hábitos maternos, muitas mães entrevistadas tinham alguma dificuldade em precisar exatamente os hábitos durante o período gestacional, principalmente as que tinham filhos mais velhos, mas 26 (13,4%) foram fumantes ativas durante todo o período da gestação, 18 (9,3%) foram fumantes passivas, 13 (6,7%) relataram que fizeram a ingestão de bebida alcoólica mais do que duas vezes por semana e 1 (0,5%) fez uso de drogas ilícitas como a maconha e cocaína (Tabela 5). Durante a gestação, 57 (29,4%) mães descreveram algum tipo de intercorrência, sendo as mais frequentes as infecções urinárias (37,5%) e o estresse (29,8%). Destas que tiveram problemas durante o período gestacional, 23 (11,9%) necessitaram fazer uso de algum tipo de medicamento durante o primeiro trimestre de gestação (Tabela 5). Entre estes medicamentos destaca-se a utilização de antibióticos em 21 (91,3%) casos, particularmente amoxicilina, e anticonvulsivantes em 2 (8,7%) dos casos.

Quando as mães foram questionadas se haviam tido algum contato com substâncias químicas no primeiro trimestre de gestação, 147 (75,7%) das entrevistadas responderam que não tiveram nenhum tipo de contato, 8 (4,3%) tiveram contato direto com substâncias diversas como, por exemplo, tinta gráfica e produtos utilizados em laboratórios. Uma das substâncias a que as mães também se referiram foi à exposição a agrotóxicos, sendo que 17 (8,7%) tiveram contato direto, e 22 (11,3%) tiveram contato indireto com inseticidas, herbicidas, pesticidas e fungicidas (Tabela 5).

Referente a profissão das mães, 101 (52,1%) das entrevistadas eram donas de casa, 38 (28,4%) trabalhavam em atividades técnicas, 17 (8,8%) como

autônomas, 17 (8,8%) lavradoras, 12 (6,2%) empregadas domésticas e apenas 9 (4,6%) atuavam em atividades com formação de nível superior.

Quando questionadas sobre a utilização de suplementação vitamínica durante a gestação, 37 (19,1%) iniciaram o uso de ácido fólico ou complexo multivitamínico durante o primeiro trimestre de gestação sendo que apenas 4 mães (10,8 %) iniciaram a ingestão do ácido fólico no período pré-concepção, enquanto 157 (80,9%) não fizeram nenhum tipo de suplementação durante a gravidez, ou o fizeram uso após o primeiro trimestre de gestação (Tabela 5).

Sobre os hábitos paternos durante o período prévio a gestação, 30 (15,8%) relaram o hábito de fumar, 18 (9,3%) relataram ser alcoólatras e 5 (2,6%) fizeram uso de drogas ilícitas (maconha ou cocaína) (Tabela 6). Em relação a ocupação paterna, 89 (45,9%) realizavam atividades em áreas técnicas, 24 (12,4%) autônomos, 36 (18,6%) lavradores, 24(12,4%) prestadores de serviço e 21 (10,7%) as mães não sabiam informar, ou não se recordavam, e os pais já não estavam com a família para informar. Quando questionados sobre o contato com substâncias químicas, 130 (67%) não tiveram contato e 64 (33%) tiveram algum contato (Tabela 6). As substâncias referidas foram agrotóxicos direta ou indiretamente (n=38, 59,4%) e solventes orgânicos, tintas, combustível ou substâncias usadas na construção civil (n=26, 40,6%).

Antes de nascer o filho com FL/PNS, 13 (6,7%) casais relataram histórico de aborto prévio e 5 (2,6%) tiveram filhos natimortos (Tabela 7). Consanguinidade entre os pais foi identificada em 9 (4,6%) casos, sendo a maioria (n=6) entre parentes de 3º grau (Tabela 7). No que se refere ao histórico familiar de fissuras orofaciais, 43 (22,2%) casais apresentaram histórico de afetados na família, sendo o grau de parentesco em pais ou irmãos em 37,2% dos casos (1º geração), em tios e avós em 27,9% dos casos (2º geração), e em parentes de 3º grau em 34,9% dos casos, sem muitas vezes saber precisar qual o tipo de fissura (Tabela 7). Dos entrevistados que tinham parentes com FL/PNS na família, 37 sabiam dizer o tipo de fissura e as fissuras se distribuíram da seguinte maneira: 18 (48,6%) casos de FL, 17 (45,9%) casos de FLP e 2 (5,5%) casos de FP.

Quando questionados em relação ao histórico de câncer na família (focando as três primeiras gerações), 126 (64,9%) pais não relataram nenhum caso, enquanto que 68 (35,1%) relataram que tinham parentes na família que já apresentaram a doença ou estavam em tratamento para o câncer (Tabela 7). Destes, 28 (35,3%) não sabiam dizer qual o tipo de câncer o parente apresentava. Dentre os que sabiam, os mais citados foram: câncer de pulmão com 8 casos (11,8%), estômago em 6 casos (8,8%), mama e garganta ambos com 4 casos (5,9%) e os demais 22 casos (32,4%) foram enquadrados em outros tipos de câncer, como de pele, próstata, intestino e útero, entre outros.

Tabela 5. Características gestacionais das mães dos pacientes com FL/PNS

	Número de Casos	Porcentagem (%)
Idade Materna na Concepção		
≥ 20 anos	35	18
21-30 anos	120	61,9
31-40 anos	37	19,1
41-50 anos	2	1
Tabagismo		
Não	168	86,6
Sim	26	13,4
Tabagismo Passivo		
Não	176	90,7
Sim	18	9,3
Consumo de Bebidas Alcoólicas		
Não	181	93,3
Sim	13	6,7
Uso de Drogas Ilícitas		
Não	193	95,5
Sim	1	0,5
Uso de Medicamentos		
Não	171	88,1
Sim	23	11,9
Contato com Substâncias Químicas		
Sem Contato	147	75,7
Contato Direto com Agrotóxicos	17	8,7
Contato Indireto com Agrotóxicos	22	11,3
Contato com Outras Substâncias	8	4,3
Uso de Suplementação Vitamínica		
Não	157	80,9
Sim	37	19,1

Tabela 6. Características dos pais dos pacientes com FL/PNS deste estudo.

	Número de Casos	Porcentagem
Idade Paterna na Concepção		
≥ 20 anos	23	11,9
21-30 anos	113	58,2
31-40 anos	48	24,7
41-50 anos	10	5,2
Tabagismo		
Não	164	84,5
Sim	30	15,8
Consumo de Bebidas Alcoólicas		
Não	176	90,7
Sim	18	9,3
Uso de Drogas Ilícitas		
Não	189	97,4
Sim	5	2,6
Contato com Substâncias Químicas		
Sem Contato	130	67
Contato Direto com Agrotóxicos	28	14,4
Contato Indireto com Agrotóxicos	10	5,2
Contato com Outras Substâncias	26	13,4

Tabela 7. Histórico e características familiares dos pais dos pacientes com FL/PNS

	Número de Casos	Porcentagem (%)
Antecedentes Gestacionais		
Nenhum	176	90,7
História de Aborto	13	6,7
História de Natimorto	5	2,6
Consanguinidade		
Não	185	95,4
Sim	9	4,6
Histórico de Fissura Orofacial na Família		
Não	151	77,8
Sim	43	22,2
História de Câncer na Família		
Não	126	64,9
Sim	68	35,1

5.3 Associação dos tipos de fissuras com características clínicas, demográficas e ambientais

Para fins estatísticos, as fissuras submucosas foram excluídas e a análise foi realizada considerando 3 grupos (FL, FLP e FP) ou 2 grupos, visto que FL e FLP foram agrupadas para forma FL±P. Contudo, como não houve diferenças significativas entre as análises com 2 e 3 grupos; então apenas a análise considerando as FLs, FLPs e FPs são apresentadas nesses resultados.

A análise da influência da idade materna e paterna durante a concepção do filho com FL/PNS não revelou nenhuma influência significativa nos três grupos apresentados (Fig. 1). Tabela 8 descreve a distribuição das características clínicas, demográficas e ambientais de acordo com tipo de fissura orofacial. Nesta análise nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada. Adicionalmente, uma significativa associação com alterações otorrinolaringológicas foi observada. A frequência das alterações otorrinolaringológicas foi significativamente maior em FPs em comparação com FLs ($p=0,013$), enquanto que a diferença entre FLPs e FPs não alcançou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,07$).

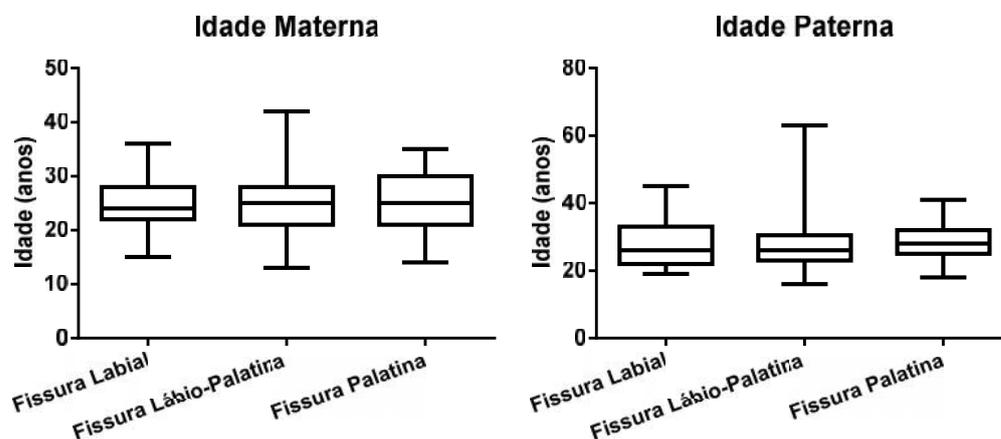


Figura 1. Prevalência de FL/P e idade dos genitores. Não houve influência da idade materna e paterna durante a concepção entre os tipos de fissuras.

Tabela 8. Associação das fissuras orofaciais com características clínicas, demográficas e ambientais.

	Fissura Labial n (%)	Fissura Lábio-Palatina n (%)	Fissura Palatina n (%)	Valor de $p < 0,05$
Gênero				
Masculino	30 (63,8)	69 (65,7)	22 (61,1)	0,88
Feminino	17 (36,2)	36 (34,3)	14 (38,9)	
Cor da Pele				
Leucoderma	42 (89,4)	93 (88,6)	32 (88,8)	0,17
Feoderma	4 (8,5)	12 (11,4)	2 (5,6)	
Melanoderma	1 (2,1)	0	2 (5,6)	
Lateralidade das Fissuras				
Direita	12 (27,9)	23 (32,9)	0	0,58
Esquerda	31 (72,1)	47 (67,1)	0	
Alterações Sistêmicas Associadas				
Não	35 (74,5)	84 (80,0)	25 (69,4)	0,40
Sim	12 (25,5)	21 (20,0)	11 (30,6)	
Número de Alterações Sistêmicas				
Uma	10 (83,3)	17 (81,0)	8 (72,7)	0,80
Duas ou mais	2 (16,7)	4 (19,0)	3 (17,3)	
Tabagismo Materno				
Não	40 (85,1)	93 (88,6)	30 (83,3)	0,67
Sim	7 (14,9)	12 (11,4)	6 (16,7)	
Tabagismo Materno Passivo				
Não	44 (93,6)	92 (87,6)	34 (94,4)	0,33
Sim	3 (6,4)	13 (12,4)	2 (5,6)	
Consumo Materno de Bebidas Alcoólicas				
Não	43 (91,5)	99 (94,3)	33 (91,7)	0,76
Sim	4 (8,5)	6 (5,7)	3 (8,3)	
Uso Materno de Drogas Ilícitas				
Não	46 (97,9)	100 (100)	100 (100)	0,22
Sim	1 (2,1)	0	0	
Uso Materno de Medicamentos				
Não	39 (83,0)	97 (92,4)	30 (83,3)	0,14
Sim	8 (17,0)	8 (7,6)	6 (16,7)	
Contato Materno com Substâncias Químicas				
Sem Contato	39 (83,0)	74 (70,5)	28 (77,8)	0,34
Contato Direto com Agrotóxicos	1 (2,1)	12 (11,4)	4 (11,1)	
Contato Indireto com Agrotóxicos	4 (8,5)	14 (13,3)	4 (11,1)	
Contato com Outras Substâncias	3 (6,4)	5 (4,8)	0	

Uso de Suplementação Vitamínica				
Não	37 (78,7)	89 (84,8)	25 (69,4)	
Sim	10 (21,3)	16 (15,2)	11 (30,6)	0,13
Tabagismo Paterno				
Não	42 (89,4)	88 (83,8)	28 (77,8)	
Sim	5 (10,6)	17 (16,2)	8 (22,2)	0,35
Consumo Paterno de Bebidas Alcoólicas				
Não	44 (93,6)	95 (90,5)	32 (88,9)	
Sim	3 (6,4)	10 (9,5)	4 (11,1)	0,73
Uso Paterno de Drogas Ilícitas				
Não	46 (97,9)	101 (96,2)	36 (100)	
Sim	1 (2,1)	4 (3,8)	0	0,45
Contato Paterno com Substâncias Químicas				
Sem Contato	35 (74,5)	66 (62,9)	23 (63,9)	
Contato Direto com				
Agrotóxicos	4 (8,5)	20 (19,0)	4 (11,1)	
Contato Indireto com				
Agrotóxicos	2 (4,3)	6 (5,7)	2 (5,6)	
Contato com Outras				
Substâncias	6 (12,7)	13 (12,4)	7 (19,4)	0,58
Consanguinidade				
Não	45 (95,7)	100 (95,2)	34 (94,4)	
Sim	2 (4,3)	5 (4,8)	2 (5,6)	0,96
História de Aborto				
Não	43 (91,5)	98 (93,3)	35 (97,2)	
Sim	4 (8,5)	7 (6,7)	1 (2,8)	0,56
História de Natimorto				
Não	45 (95,7)	102 (97,1)	36 (100)	
Sim	2 (4,3)	3 (2,9)	0	0,48
História de Fissura Orofacial na Família				
Não	37 (78,7)	80 (76,2)	28 (77,8)	
Sim	10 (21,3)	25 (23,8)	8 (22,2)	0,93
História de Câncer na Família				
Não	30 (63,8)	74 (70,5)	20 (55,6)	
Sim	17 (36,2)	31 (29,5)	16 (44,4)	0,24

Teste Qui- quadrado / Significância de $p < 0,05$

5.4 Análise dos polimorfismos genéticos dos genes de reparo do DNA

A análise dos polimorfismos genéticos em genes de reparo do DNA foi realizada nos 223 trios, sendo que só fizeram parte desse grupo pacientes com FL e FL/P NS, sendo 66 (29,6%) de pacientes com FL e 157 (70,4%) de pacientes com FLP (Tabela 9). Entre os pacientes com FL, 38 (57,6%) foram do gênero masculino e 28 (42,4%) do gênero feminino (Tabela 9). O predomínio de indivíduos do gênero masculino também foi observado entre os pacientes com FLP no estudo epidemiológico (n=98, 62,4%, Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição dos pacientes com FL/PNS, de acordo com o tipo de fissura e gênero, utilizados no ensaio de TDT.

	FL±P	FL	FLP
	n (%)	n (%)	n (%)
Masculino	136 (61)	38 (57,6)	98 (62,4)
Feminino	87 (39)	28 (42,4)	59 (37,6)
Total	223	66	157

O equilíbrio de Hardy-Weinberg entre os genitores (indivíduos normais) não foi observado para os polimorfismos rs1136410 e rs1799793 dos genes ADPRT e ERCC2 respectivamente (Tabela 10). Como, por princípio, o TDT corrige possíveis erros na estratificação étnica da população estudada, pois a sua análise ocorre em núcleos familiares, nós mantivemos, nesta análise, os polimorfismos que não respeitaram os preceitos do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Contudo, é de conhecimento que nestas circunstâncias o poder de detecção do teste reduz (Sebro *et al.*, 2010).

Tabela 10. Cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os 12 polimorfismos deste estudo baseado nos genitores (pais e mães normais) dos 223 núcleos familiares.

Polimorfismo	Valor de χ^2	Valor de p
rs1136410	17,08	0,000036
rs1052133	0,01	0,92
rs1800734	1,15	0,28
rs1130409	0,04	0,84
rs861539	2,01	0,16
rs1801321	0,21	0,64
rs25487	0,36	0,55
rs25489	1,98	0,16
rs3213245	2,61	0,10
rs1799782	2,06	0,15
rs13181	1,34	0,24
rs1799793	4,46	0,03

Tabelas 11, 12 e 13 demonstram os resultados do TDT nos 12 polimorfismos genéticos deste estudo em relação ao tipo de fissura. Com exceção dos polimorfismos rs25489 e rs1799782, a menor frequência do alelo (MAF) foi superior a 15% (Tabela 11). Para nenhum dos polimorfismos deste estudo, uma associação significativa foi observada. Contudo, o polimorfismo rs3213245 revelou uma transmissão preferencial do alelo C ($p=0,06$). A frequência do alelo C foi de 0,359, e a transmissão de um dos genitores para o filho com FLP ocorreu em 42,1% dos núcleos familiares (Tabela 13). Interessantemente, o alelo C do polimorfismo rs3213245 foi transmitido de maneira significativa para os pacientes com FL ($p=0,03$, Tabela 12). Essa transmissão ocorreu em 30 (45,5%) dos núcleos familiares (Tabela 13). Outro polimorfismo que mostrou uma tendência de associação, significativa foi o rs13181 em pacientes com FLP ($p=0,06$, Tabela 13).

Os haplótipos dos 4 polimorfismos no gene *XRCC1* (rs25487, rs25489, rs321345 e rs1799782) e dos 2 polimorfismos no gene *ERCC2* (rs13181 e rs1799793) foram determinados. No geral, o haplótipo formado pelos alelos G-G-T-C no gene *XRCC1* demonstrou uma tendência de associação com FL/PNS ($p=0,06$ Tabela 14), enquanto que este mesmo haplótipo demonstrou uma associação significativa no grupo das FLs ($p=0,02$, Tabela 12). Nenhuma associação significativa foi observada para os haplótipos do gene *ERCC2*.

Tabela 11. Teste de desequilíbrio de transmissão para os 12 polimorfismos genéticos dos genes de reparo do DNA em 223 trios de FL±P.

SNP	rs1136410	rs1052133	rs1800734	rs1130409	rs861539	rs1801321	rs25487	rs25489	rs3213245	rs1799782	rs13181	rs1799793
GENE	ADPRT	OGG1	MLH1	APEX1	XRCC3	RAD51	XRCC1	XRCC1	XRCC1	XRCC1	ERCC2	ERCC2
MAF	0,156	0,226	0,239	0,432	0,309	0,347	0,245	0,083	0,359	0,085	0,291	0,262
Genótipo	TT/TC/CC	CC/CG/GG	GG/GA/AA	TT/TG/GG	CC/CT/TT	GG/GT/TT	GG/GA/AA	GG/GA/AA	TT/TC/CC	CC/CT/TT	TT/TG/GG	GG/GA/AA
Afetado (%)	69,4/30,6/0	61,3/32,9/5,8	56,5/40,3/3,2	36,4/41,8/21,8	49,3/43,4/7,3	44,8/41,2/14	58,6/35/6,4	82/17,1/0,9	41,9/46,4/11,7	85,5/13,6/0,9	46,1/46,1/7,8	53,6/36/10,4
Pai (%)	64,4/35,6/0	58,3/35,5/6,3	55,9/36,9/7,2	25,8/54,3/19,9	48,9/42,1/9	42,1/44,3/13,6	55,2/38,9/5,9	84,3/14,3/1,4	40,1/44,6/15,3	82,9/17,1/0	48,2/43,7/8,1	51,8/43,7/4,5
Mãe (%)	70,7/29,3/0	57,9/37,1/5	57/40,3/2,7	37,4/43,7/18,9	43,9/48,9/7,2	42,5/48/9,5	57/37,5/5,5	86,4/13,1/0,5	43/41,6/15,4	82,4/17,1/0,5	51,1/43/5,9	53,7/41,8/4,5
T/NT	62/161	86/137	95/128	83/140	109/114	100/123	91/132	38/185	94/129	32/191	95/128	101/122
Valor de p	0,16	0,19	0,37	0,88	0,18	0,51	0,42	0,59	0,06	0,17	0,25	0,65

MAF: menor frequência alélica (minor allele frequency), T/NT: transmissão/não transmissão.

Tabela 12. Teste de desequilíbrio de transmissão para os 12 polimorfismos genéticos dos genes de reparo do DNA em 66 trios de FL.

SNP	rs1136410	rs1052133	rs1800734	rs1130409	rs861539	rs1801321	rs25487	rs25489	rs3213245	rs1799782	rs13181	rs1799793
GENE	ADPRT	OGG1	MLH1	APEX1	XRCC3	RAD51	XRCC1	XRCC1	XRCC1	XRCC1	ERCC2	ERCC2
MAF	0,158	0,254	0,266	0,396	0,303	0,379	0,262	0,105	0,341	0,072	0,277	0,258
Genótipo	TT/TC/CC	CC/CG/GG	GG/GA/AA	TT/TG/GG	CC/CT/TT	GG/GT/TT	GG/GA/AA	GG/GA/AA	TT/TC/CC	CC/CT/TT	TT/TG/GG	GG/GA/AA
Afetado (%)	70,7/29,3/0	63,6/24,2/12,2	50/45,5/4,5	36,3/47/16,7	50,8/43/6,2	31,8/53/15,2	56/36,4/7,6	77/23/0	53,9/36,9/9,2	89,3/9,2/1,5	57/36,9/6,1	65,2/25,7/9,1
Pai (%)	66,7/33,3/0	59,1/30,3/10,6	51,5/41/7,5	34,9/45,4/19,7	50/42,4/7,6	39,4/45,4/15,2	54,5/37,9/7,6	77,3/19,7/3	48,5/34,8/16,7	86,4/13,6/0	48,4/44/7,6	48,5/47/4,5
Mãe (%)	71,2/28,8/0	57,6/37,9/4,5	54,5/42,5/3	40,9/44/15,1	43,9/47/9,1	37,9/45,4/16,7	51,5/42,4/6,1	84,8/15,2/0	43,9/43,9/12,2	84,8/15,2/0	56/38/6	59,1/34,8/6,1
T/NT	18/48	30/36	32/34	24/42	32/34	23/43	29/37	15/51	30/36	7/59	28/38	23/43
Valor de p	0,53	0,77	0,79	0,51	0,35	0,30	0,48	0,83	0,03	0,49	0,50	0,17

MAF: menor frequência alélica (minor allele frequency), T/NT: transmissão/não transmissão.

Tabela 13. Teste de desequilíbrio de transmissão para os 12 polimorfismos genéticos dos genes de reparo do DNA em 157 trios de FLP.

SNP	rs1136410	rs1052133	rs1800734	rs1130409	rs861539	rs1801321	rs25487	rs25489	rs3213245	rs1799782	rs13181	rs1799793
GENE	ADPRT	OGG1	MLH1	APEX1	XRCC3	RAD51	XRCC1	XRCC1	XRCC1	XRCC1	ERCC2	ERCC2
MAF	0,158	0,224	0,227	0,449	0,311	0,327	0,231	0,073	0,374	0,088	0,299	0,268
Genótipo	TT/TC/CC	CC/CG/GG	GG/GA/AA	TT/TG/GG	CC/CT/TT	GG/GT/TT	GG/GA/AA	GG/GA/AA	TT/TC/CC	CC/CT/TT	TT/TG/GG	GG/GA/AA
Afetado (%)	68,8/31,2/0	60,3/36,5/3,2	59,4/38/2,6	36,4/39,6/24	48,7/43,6/7,7	50,3/36,1/13,6	59,7/34,5/5,8	84/14,7/1,3	38,2/49,1/12,7	84/15,4/0,6	41,5/50/8,5	48,1/41/10,9
Pai (%)	63,5/36,5/0	58/37,6/4,4	57,7/35,3/7	22/58/20	48,3/42/9,7	43,2/43,8/13	55,5/39,4/5,1	87,3/12,1/0,6	37,2/48,1/14,7	81,4/18,6/0	48,1/43,6/8,3	53,2/42,3/4,5
Mãe (%)	70,5/29,5/0	58/36,8/5,2	58/39,4/2,6	35,9/43,6/20,5	43,9/49,7/6,4	44,5/49/6,5	59,4/35,5/5,1	87,1/12,3/0,6	43,2/40,6/16,2	80,7/18,7/0,6	49/45,2/5,8	50,7/45,5/3,8
T/NT	49/108	62/95	63/94	59/98	77/80	77/80	62/95	23/134	61/96	24/133	67/90	77/80
Valor de p	0,32	0,26	0,25	0,47	0,44	0,20	0,57	0,41	0,49	0,29	0,06	0,19

MAF: menor frequência alélica (minor allele frequency), T/NT: transmissão/não transmissão.

Tabela 14. Distribuição dos haplótipos nos genes *XRCC1* (rs25487, rs25489, rs321345 e rs1799782) e *ERCC2* (rs13181 e rs1799793) por tipo de fissura nos 223 trios deste estudo.

	FL±P	FL	FLP
	Frequência/valor de p	Frequência/valor de p	Frequência/valor de p
<i>XRCC1</i> (rs25487-rs25489-rs321345-rs1799782)			
G-G-C-C	0,353/0,24	0,305/0,09	0,366/0,87
G-G-T-C	0,244/0,06	0,259/0,02	0,240/0,83
A-G-T-C	0,233/0,99	0,241/0,96	0,229/0,92
G-G-T-T	0,078/0,35	0,089/0,67	0,086/0,63
G-A-T-C	0,072/0,23	0,077/0,51	0,061/0,24
<i>ERCC2</i> (rs13181-rs1799793)			
T-G	0,655/0,31	0,656/0,33	0,642/0,38
G-A	0,202/0,63	0,272/0,58	0,264/0,10
G-G	0,084/0,27	0,067/0,65	0,063/0,06
T-A	0,059/0,95	0,005/NA	0,031/0,38

NA: não aplicável

6 DISCUSSÃO

6.1 Características clínicas dos pacientes com FL/PNS

Estima-se que 60% a 80% dos pacientes com FL/PNS sejam do gênero masculino (Tolarova, 1998; Loffredo *et al.*, 2001; Wyszynski, 2002; Mossey *et al.*, 2009). Em relação a esta característica, a maioria dos pacientes incluídos neste estudo foram do gênero masculino. Dados similares também foram relatados em estudos internacionais realizados na Espanha (Garcia *et al.*, 1998), Dinamarca (Hagberg *et al.*, 1998), Croácia (Magdalení *et al.*, 1997), Filipinas (Murray *et al.*, 1998) e Irã (Mirfazeli *et al.*, 2012). No Brasil estudos prévios, também descreveram uma maior frequência de FL/PNS nos indivíduos do gênero masculino (Fonseca *et al.*, 1971; Freitas *et al.*, 2004; Lofredo *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2006; Martelli-Júnior *et al.*, 2007; Rezende & Zollner, 2008; Coutinho *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009; Gardenal *et al.*, 2011; Martelli *et al.*, 2012). Dois estudos semelhantes realizados no Estado do Paraná, um na região norte com 377 fissurados e o outro na região sul do estado, registraram uma proporção de aproximadamente 1,5 homens afetados para cada mulher com FL/PNS (Baroneza *et al.*, 2005; Souza & Raskim, 2011). A susceptibilidade dependente do gênero ainda não está completamente esclarecida. Segundo Blanco *et al.* (2001) a susceptibilidade do gênero masculino para a FL/PNS parece ser, ao menos em parte, uma consequência de variações no gene *MSX1* que são mais comuns em homens com FL/PNS. Embora isso não seja confirmado, levantou-se também a hipótese de que genes localizados no cromossomo X tenham um papel importante na etiologia das fissuras (Kimani *et al.*, 2007). Interessantemente, as FL±Ps são mais frequentes em homens, enquanto as FPs são mais frequentes nas mulheres. Segundo Lary *et al.* (2001) a explicação para isso reside no fato de que o palato primário do feto feminino demora em média 1 semana a mais para fechar do que o palato do feto masculino, aumentando a predisposição à ação de fatores ambientais nocivos na formação da FP.

Em relação ao tipo de fissura, a maior prevalência de casos foi a FLP. Dados semelhantes foram relatados em outros estudos com a população

Brasileira (Rezende *et al.*, 1982; Bunduki *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2003; Al Omari & Al Omari, 2004; Martelli *et al.*, 2007; Martelli *et al.*, 2010). Loffredo *et al.* (2001) constataram que, de um total de 16.853 casos de fissuras orais, 4.413 (26%) se referiam à FP isolada, enquanto que a maior proporção foi de FL±Ps (74%). Freitas *et al.* (2004) investigaram a distribuição dos vários tipos de fissuras entre os 803 pacientes que compareceram ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC-USP), Bauru-SP, no ano de 2000. A FLP completa foi mais frequente do que outros tipos de fissuras, compreendendo 37,1% dos quais 24,9% foram unilaterais e 12,2% bilaterais. A FP isolada correspondeu a 31,7% e a FL isolada correspondeu a 28,4%. Foi notada uma discreta relação entre a FP e o gênero feminino (53%), sendo o gênero masculino mais afetado pelos outros tipos de fissuras (cerca de 60%).

Quanto à lateralidade das fissuras, as unilaterais foram as mais prevalentes, ocorrendo mais que as bilaterais, tanto nos casos de FL como nos de FLP. Os dados da literatura convergem para uma maior incidência das fissuras unilaterais (Bunduki *et al.*, 2001), coincidindo com os nossos achados e com os estudos de Rezende *et al.*, 1981 e Tolarova *et al.*, 1987. Analisando o lado mais acometido, notou-se que o esquerdo foi mais frequente que o direito. Um estudo realizado na Dinamarca, mostrou uma incidência de 44,3% de fissura à esquerda e 26,8% de fissura à direita, com o restante representando envolvimento bilateral (Jensen *et al.*, 1988). Esses dados são similares aos encontrados na Croácia em um estudo realizado com 903 fissurados, que constatou uma prevalência de 51% de fissura a esquerda, 18,5% de fissura a direita e 30,5% de envolvimento bilateral (Magdalenic *et al.*, 1988). Não há, até o momento, uma explicação fisiopatológica para esta distribuição preferencial das fissuras pelo lado esquerdo (Stoll *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2005; Genisca *et al.*, 2009). Sabe-se que os órgãos internos de todos os vertebrados são organizados de forma assimétrica ao longo do eixo esquerdo-direito, e o desenvolvimento desta assimetria, é controlado de forma cada vez mais conhecida (Oliverio *et al.*, 2010). Uma possível explicação seria a expressão assimétrica de um grupo de genes expressos

durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário pertencentes à cascata de sinalização nodal. Esta sinalização ocorre devido a proteínas codificadas por genes que são expressos predominantemente no lado esquerdo de todos os embriões de vertebrados (Boorman *et al.*, 2002). Padrões de lateralidade de defeitos externos são reconhecidamente vistos em vários tipos de anomalias, como na microtia e no pé torto congênito, com predileção pelo lado direito, e FL/PNS e displasia congênita do quadril para o lado esquerdo (Paulozzi *et al.*, 1999). É possível que defeitos nessa via de sinalização possam contribuir para essa predileção, entretanto nenhum estudo ainda confirmou esta observação.

As complicações que acompanham os pacientes com FL/PNS são complexas e vão muito além das alterações faciais, havendo dificuldades de alimentação, alterações variadas na fonação, infecções de repetição do ouvido médio, entre outras dificuldades. Gorlin *et al.* (2001) afirmaram que quanto à existência de alterações associadas, 2% a 11% dos casos de FLP possuem outras alterações congênitas, 7% a 13% quando há FL isolada e 13% a 50% quando há somente FP. Nos achados do nosso estudo, no que diz respeito às alterações sistêmicas, a maior parte dos pacientes não relataram nenhuma alteração, mas 48 (24,8%) dos pacientes apresentavam, no mínimo, uma alteração associada. Dentre as mais citadas pelos entrevistados, a bronquite alérgica (n=13, 21%) e otites de repetição (n=10, 16,1%) foram às complicações mais frequentes. Em relação à extensão da fissura, a frequência das alterações otorrinolaringológicas foi significativamente maior em FPs em comparação com FLs. Esses dados já eram esperados tendo em vista o maior comprometimento favorecido pela FP pois a mesma dificulta o equilíbrio da pressão do ar no ouvido médio. Estes resultados vão de acordo com os estudos de Smith *et al.* (1994) e de Shaw *et al.* (2003) que também apontam as otites e problemas de ouvido, queixas frequentes em fissurados, principalmente no caso das FL±P. Outro estudo também citou a otite como uma complicação frequente que pode ocorrer geralmente entre o segundo e o oitavo mês após as cirurgias de palatoplastia (Vlastos *et al.*, 2009). Além da otite, 8 (12,9%) casos apresentaram amidalite recorrente e 7 (11,3%) alérgica.

Jorgeson & Pashayan (1990) encontraram a malformação cardíaca como sendo uma das complicações mais frequentes nos pacientes com FL/PNS, sendo que 30% das crianças com FL/PNS apresentam algum tipo de cardiopatia congênita. No presente estudo, as alterações cardíacas foram observadas em apenas 6 (9,7%) pacientes. Huseyin *et al.* (2012), em um estudo na Turquia, encontraram 17% de alterações musculoesqueléticas em pacientes com fissuras orofaciais não-sindrômicas. No estudo de Troviscal *et al.* (2002), outras alterações, não investigadas em nosso estudo, foram encontradas como a assimetria de orelha, observada em 21% dos pacientes, retardo de crescimento pré- e pós-natal, insuficiência velofaríngea, atresia de esôfago, anomalias nas vértebras, anomalias olfatórias e anomalias do trato urinário. Em adição, foi reportado que indivíduos com FL/PNS têm uma frequência 40 vezes maior, do que a população em geral, de apresentar deficiência do hormônio de crescimento (Gorlin *et al.*, 2001). Vale ressaltar que alguns pacientes que frequentam a associação onde foi realizada a coleta, nunca passaram pela avaliação de um geneticista, assim os casos que havia malformações múltiplas, podendo caracterizar ou ter alguma semelhança com sinais sindrômicos, não foram incluídos neste estudo, respeitando os critérios de inclusão estabelecidos nesta pesquisa.

O protocolo descrito por Freitas *et al.* (2012) considera que o tempo ideal para a realização da primeira cirurgia reparadora de lábio é até o terceiro mês de idade, e a cirurgia do palato (palatoplastia) deve ser realizada até o 12º mês. Para Ribeiro & Moreira (2005), a estafilorrafia e a queiloplastia devem ser realizadas no terceiro mês de vida, enquanto a palatoplastia entre os doze e dezoito meses de idade. Essas cirurgias objetivam a correção funcional da lesão, enquanto outras cirurgias plásticas posteriores podem ser necessárias para correção estética das alterações faciais. Segundo Yoon *et al.*, 2004, a fala, a voz e a audição melhoram com o fechamento precoce do palato e o fechamento tardio do palato, após 4 anos de idade, favorece o crescimento inadequado do esqueleto facial. A demora no acesso a primeira cirurgia pode decorrer, do fato que a maioria dos pacientes do estado do Paraná, é encaminhada para um único centro de atendimento de alta

complexidade. A distância da cidade de origem, a necessidade de deslocamento e hospedagem, as dificuldades de agendamento e também a falta de vagas para cirurgia, associadas às complicações respiratórias frequentemente presentes no quadro clínico dos pacientes, dificultam a realização da cirurgia e as correções acabam ocorrendo tardiamente.

6.2 Características dos pais dos pacientes com FL/PNS

A idade materna avançada é considerada um fator de risco para diversas doenças genéticas, mas não existe um consenso se representa ou não um fator de risco para FL/PNS. Alguns estudos sugerem uma associação entre FL/PNS e idade materna (Hay *et al.*, 1967; Bille *et al.*, 2005; Kot *et al.*, 2007), mas os resultados ainda são conflitantes. Um estudo realizado na Califórnia demonstrou que mulheres com idade superior a 39 anos apresentam duas vezes maior risco de ter um filho com FL/PNS comparado a mães com idade entre 25 e 29 anos (Murray *et al.*, 1997). Análise epidemiológica com a população chinesa encontrou uma relação entre idade materna avançada e FL/PNS bilaterais no gênero masculino e FP no gênero feminino (Menezes *et al.*, 2009). Contudo, estudos realizados no Canadá, Irã, Holanda e América do Sul não mostraram relação entre idade materna e ocorrência de FL/PNS (Emanuel *et al.*, 1973). Outro estudo encontrou associação entre FL/PNS e mulheres jovens (Fonseca *et al.*, 1971). Martelli-Júnior *et al.* (2010) revelaram que os intervalos temporais de 26 a 35 anos e acima de 35 anos apresentaram riscos reduzidos para ocorrência de FL/PNS comparados a mulheres com idade até 25 anos. Em uma meta-análise realizada por Vieira *et al.* (2002) não foi constatada associação entre idade materna e FL/PNS de maneira geral. Em outro estudo de meta-análise, Herkrath *et al.* (2011) concluíram que os pais com idade ≥ 40 anos têm maior probabilidade (58%) de ter uma criança com fissura em comparação com aqueles com idade entre 20 e 39 anos. A probabilidade de mães com idade entre 35 e 39 anos ter um filho com fissura palatina foi 20% maior em comparação com aquelas entre 20 e 29 anos, enquanto para aquelas com ≥ 40 anos a probabilidade foi de 28% maior em

comparação com aqueles com idade entre 20 e 29 anos (Herkrath *et al.*, 2011). Os resultados do presente estudo demonstraram que na maioria dos casos (n=120, 61,9%), a idade materna e paterna foi entre 21-30 anos, não sendo observado a significativa relação para o risco de FL/PNS, fato também já descritos em outros estudos (Veira *et al.*,2002; Martelli *et al.*,2010).

Em relação aos hábitos maternos no que tange ao tabagismo, 26 (13,4%) mães foram fumantes ativas e 18 (9,3%) fumantes passivas. Os estudos sobre a atuação do tabagismo materno na etiologia das FL/PNS são contraditórios, porém as evidências do envolvimento desse fator ambiental estão aumentando conforme mais estudos são realizados (Grewam *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Bing *et al.*, 2011). Em geral, os estudos recentes apontam para uma correlação positiva entre tabagismo materno e aparecimento de FL/PNS. O efeito parece ser dose-dependente, ou seja, quanto mais cigarros a mãe consumir por dia maior o risco para o feto (Lieff *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2000; Lorente *et al.*, 2000). Uma meta-análise com 24 estudos realizada por Little *et al.* (2002) observou um aumento no risco para fissuras orofaciais em relação ao tabagismo materno durante a gestação. Os autores caracterizam a associação como moderada, porém, estatisticamente significativa. Em relação ao tabagismo paterno, 30 (15,8%) dos pais tiveram contato com o cigarro antes e durante o primeiro trimestre. Leite (2002) investigou a associação entre a ocorrência de fissuras e a história de exposição dos pais prévia ou durante o primeiro trimestre de gestação ao tabagismo e etilismo e registrou que tanto o tabagismo quanto o etilismo paterno não elevaram o risco de desenvolvimento desta malformação. Resultados diferentes revelaram os trabalhos de Shi *et al.* (2001) e Chang *et al.* (2006), mostrando que o tabagismo paterno também pode exercer influencia no aparecimento das fissuras uma vez que os pais tabagistas são mais susceptíveis de produzir espermatozóides anormais com dissomia do cromossomo 13 quando comparado com homens não-fumantes.

A exposição do feto ao álcool ingerido pela mãe também tem sido sugerida como um fator de risco, e diversos estudos apontam que os padrões de consumo

excessivo de álcool podem favorecer ainda mais o risco de alterações fetais (Munger *et al.*, 1996). Conforme citados, diversos fatores ambientais de natureza química podem contribuir para a ocorrência da FL/PNS, embora os mecanismos não estejam suficientemente esclarecidos para todas as exposições suspeitas e, provavelmente, participe de um fenômeno de interação com alguns genes já identificados. Assim, o tabagismo e o etilismo parecem associar-se a estas malformações, especialmente o último, embora as medidas de associação habitualmente obtidas sejam de pequena magnitude (Lorent *et al.*, 2000).

Estatísticas estimam que cerca de metade das gestações não são planejadas e que muitas mulheres expõem inadvertidamente os fetos à ação de agentes nocivos durante os períodos iniciais da embriogênese (Carmichael & Shaw, 1999). Quando questionadas a respeito da ingestão de algum medicamento durante o primeiro trimestre de gestação, 23 (11,9%) das mães deste estudo relataram que fizeram uso de medicação. O mais evidenciado foi o uso de antibiótico para a infecção urinária. A exposição a medicamentos parece ter importante ação no mecanismo que interfere no desenvolvimento embriológico, podendo resultar na falha parcial de fusão dos processos nasais médios e outras anormalidades do desenvolvimento (Leite *et al.*, 2005). O instante da administração de drogas teratogênicas é muito importante se relacionarmos ao período de morfodiferenciação. Algumas drogas que teriam íntima relação com o desenvolvimento das fissuras orofaciais só atuam no momento da embriogênese dos processos oropalatinos (Leite *et al.*, 2002). Desta forma pode se afirmar que o momento crítico de ação destas substâncias situa-se no primeiro trimestre de gestação. Inúmeros trabalhos já foram realizados no intuito de comprovar a teratogenicidade de várias medicações (Austin *et al.*, 1998; Park-Wyllie *et al.*, 2000; Kozler *et al.*, 2002; Elahi *et al.*, 2004). Em relação às fissuras orofaciais, o grupo dos anticonvulsivantes são os mais extensivamente estudados e têm seus efeitos comprovados nesta malformação (Rosemberg *et al.*, 1983; Castilla *et al.*, 1996; Czeizel *et al.*, 1997). Alguns autores chegam a afirmar que há um risco 2 vezes maior em nascer com fissuras orofaciais os filhos de mães

epilépticas que continuaram o tratamento durante a gravidez (Leite *et al.*, 2005). O uso de corticóides também foi investigado em uma meta análise conduzida por Park-Wyllie *et al.* (2000). Estes autores encontraram uma significativa associação entre corticóide usado no 1º trimestre de gestação e fissuras orais, com um risco estimado de 3,35%. Medicamentos psicotrópicos também já foram estudadas como responsáveis pelo surgimento das fissuras orofaciais (Austin & Mitchell, 1998).

As pesquisas sobre o efeito de exposições ambientais e ocupacionais e a ocorrência de malformações congênitas ganham importância à medida que a proporção de mulheres em idade fértil ocupando a força de trabalho se torna crescente. Assim, o monitoramento de sua exposição, bem como dos possíveis desfechos de suas gestações, pode vir a representar uma oportunidade única de identificação de exposições danosas para a mãe e para o conceito. Os efeitos tóxicos dos agentes ambientais sobre a reprodução humana são de diferentes tipos. Os efeitos embriotóxicos ou fetotóxicos são aqueles que causam danos ao embrião ou ao feto, dependendo da época da gestação. Os gonadotóxicos são aqueles tóxicos às glândulas genitais (masculina ou feminina) responsáveis pela formação das células reprodutoras. Os efeitos teratogênicos são os defeitos, geralmente verificados ao nascimento, provocados a partir de danos ao embrião ou às células fetais, mutações no ovo ou em células do esperma a partir de inibição enzimática causada por xenobióticos, de privação de nutrientes essenciais ou ainda por alteração da membrana placentária (Wilson *et al.*, 1977). A função reprodutiva das mulheres requer uma interação normal do eixo hipotalâmico (hipofisário) ovariano. A interferência de xenobióticos pode impedir o funcionamento normal do processo ovariano desde a oogênese, foliculogênese, função folicular, ovulação, luteinização e função do corpo lúteo. Infelizmente poucos dados atuais são disponíveis em relação à vulnerabilidade do sistema reprodutor feminino à exposição aos agentes tóxicos. Estudos apontam o envolvimento de várias substâncias químicas, incluindo, álcalis causando alterações menstruais, chumbo provocando amenorréia, menstruação anormal, atrofia ovariana e diminuição da fertilidade, mercúrio causando alteração na

menstruação e cádmio provocando atresia folicular (Plowchalk *et al.*, 1993). Os fatores ou condições ambientais também afetam o sistema reprodutor masculino, podendo diminuir a produção de espermatozoides causando infertilidade. Podem também causar alterações na forma ou na quantidade do material genético dos espermatozoides. Estes podem fecundar um óvulo e transmitir ou causar alterações ao bebê. Diversos outros estudos já evidenciaram a relação do contato com agrotóxicos e FL/PNS (Gordon *et al.*, 1981; Shaw *et al.*, 1988; García *et al.*, 1999; Zeljezic *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2005; Romiti *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2014). Referente ao contato com substâncias químicas, em nosso estudo, 47 (24,3%) mães reportaram algum contato, sendo que os mais evidenciados foram os agrotóxicos. Considerou-se como exposição o trabalho na agricultura e também a residência em áreas de cultivo no período prévio a sua gestação e durante o primeiro trimestre de gestação. Estas substâncias são sabidamente tóxicas e suspeitas de serem teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas, porém, pouca atenção é dispensada às suas inúmeras formulações e seus efeitos sobre a saúde da população. Diante deste fato, Gordon & Sky (1981) levantaram a hipótese de que a exposição intrauterina a estes agentes em áreas de plantio e em períodos de pico de sua utilização, principalmente no primeiro trimestre, poderia estar associada a um aumento no risco de defeitos congênitos.

Em relação à suplementação vitamínica materna durante a gravidez, apenas 37 (19,1%) das mães relataram ter feito uso de algum multivitamínico ou ácido fólico previamente a concepção ou no primeiro trimestre de gestação. Sabe-se que a suplementação materna pode estar associada à redução no risco de fissuras orais (Shaw *et al.*, 1995; Czeizel, 2004; Wilcox *et al.*, 2007). Nas últimas décadas alguns países vêm adotando uma política de fortificação alimentar com o ácido fólico visando à redução de defeitos de fechamento do tubo neural. O Brasil há mais de 10 anos já adota essa medida com fortificação das farinhas de trigo e milho com 1,5 mg/kg de ácido fólico (0,15 mg/100g) (Resolução - RDC nº 344 de 13/12/2002, DOU de 18/12/2002). Vale ressaltar que essa dose está abaixo do valor orientado pelo Instituto de Medicina e da Academia Americana que

recomenda para uma gestante a ingestão de uma dose diária de no mínimo 0,6 mg de ácido fólico como ideal para a prevenção de malformações (Bufalino *et al.*, 2010). Mesmo com resultados controversos, a importância do ácido fólico para a prevenção das FL/PNS tem sido cada vez mais difundida (Badovinac *et al.*, 2007; Wilcox *et al.*, 2007; Johnson & Little, 2008). Tolarova (1982) registrou o primeiro trabalho demonstrando o efeito do ácido fólico sobre a incidência das fissuras orofaciais. Seu estudo observou a diminuição de 65,4% de recorrência de FLP/NS após a suplementação com polivitamínico associado a altas doses de ácido fólico (10 mg). Czeizel *et al.* (1999) demonstraram que altas doses diárias de ácido fólico (6 mg) diminuíram a incidência e recorrência de fissuras orofaciais, entretanto uma dose fisiológica (< 1 mg/dia) não se mostrou eficaz. Hashmi *et al.* (2005) estudaram a incidência de FLP/NS na população do Texas, antes e após a fortificação alimentar com ácido fólico, e observaram uma diminuição de 13% na incidência de FP. Em uma meta-análise realizada por Johnson & Little (2008) foi observado que o uso de polivitamínicos pela mãe no período periconcepção diminui o risco de fissura, entretanto, não houve evidências significativas que mostraram que o ácido fólico por si só possa diminuir também este risco. Lopez *et al.* (2010) avaliaram o efeito da fortificação de alimentos com o ácido fólico sobre a incidência de anomalias congênitas no Brasil, Argentina e Chile. A análise incluiu 3.347.559 nascidos vivos no período de 1982 a 2007. Foi observada uma redução significativa no número de defeitos de fechamento do tubo neural para os três países, em especial a espinha bífida. Contudo, não se observou alteração significativa no número de casos de FL/PNS em nenhum país. No estado do Paraná, local desse estudo, Souza & Raskim (2011), relacionaram a incidência de FL/PNS com o início da fortificação de ácido fólico e observaram um decréscimo de 18,52% dos casos. Alguns estudos têm registrado a necessidade de investigar as variações genéticas que influenciam a absorção, transporte e o metabolismo do ácido fólico para melhor compreender o papel do ácido fólico na etiologia das FL/PNS (Vieira *et al.*, 2005; Bufalino *et al.*, 2010).

Conforme estudo realizado por Cunha *et al.* (2004), há uma correlação significativa entre a presença de malformados na família e a ocorrência de FL/PNS. Segundo Gonzaga *et al.* (2001), pais normais têm 0,1% de chances de ter um filho com fissura, enquanto pais normais com um filho fissurado tem de 4,5% a 15% de probabilidade de ter um próximo filho fissurado. História familiar de fissura é um achado constante, evidenciando a influência genética no aparecimento das FL/PNS (Marazita *et al.*, 1986; Kinoshita *et al.*, 1992; Mitchel *et al.*, 1996; Kot *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2013). Na etiologia heterogênea e multifatorial da fissura, se um paciente tem uma história familiar positiva, considera-se que os fatores genéticos podem ser relativamente mais fortes do que as influências ambientais. Além disso, considera-se que fatores genéticos podem influenciar no tipo, lateralidade e extensão da fissura (Kinoshita *et al.*, 1992). Goto *et al.* (2013) sugerem que uma história familiar positiva de FL/PNS pode estar associada a um risco de 2 vezes maior de FLP em comparação com FL e FP. No nosso estudo, 43 (22,2%) de casos tinham história familiar de fissuras orofaciais, dados semelhantes foram achados apontando a frequência de histórico familiar de FL/PNS de 35% no estudo de Martelli *et al.* (2010) e o parentesco mais frequente observado foi entre primos.

O câncer semelhantemente a fissura é uma doença multifatorial em que fatores ambientais e genéticos desempenham um papel significativo. Nos últimos anos estudos epidemiológicos avaliam a relação entre câncer e FL/PNS e evidenciaram que a frequência de cânceres em familiares de indivíduos com FL/PNS é maior em diversas populações quando comparadas com indivíduos sem FL/PNS (Steinwachs *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002; Castanet *et al.*, 2002; Bille *et al.*, 2005; Menezes *et al.*, 2009; Taioli *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012). No entanto, os resultados ainda são conflitantes, pois outros estudos não conseguiram encontrar uma associação entre FL/PNS e câncer (Hill *et al.*, 2003; Dietz *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013). Na amostra do nosso estudo, 68 (35%) pacientes relataram histórico de câncer em um dos membros da família. Um estudo nacional recente de Lima *et al.* (2013) não confirmam a associação de FL/PNS e câncer. Dados de uma amostra

de 358 fissurados encontraram o câncer de colo retal, mama, útero e ovário sendo os mais frequentes entre os familiares. Dados semelhantes também foram encontrados no nosso estudo que registrou como os mais frequentes o câncer de pulmão, estômago e mama. Adicionalmente, dos agentes químicos avaliados e anteriormente comentados neste trabalho, muitos já são reconhecidamente considerados fatores de risco associados ao câncer (Martelli *et al.*, 2014; Popoff *et al.*, 2013). Este é o caso do tabaco e álcool, substancialmente relacionados a neoplasias de diferentes localizações anatômicas (boca, esôfago, laringe), pesticidas e inseticidas, bem como outros compostos químicos representados por solventes orgânicos associados a linfomas não Hodgkin (Rego, 1998) e tumores de pâncreas (Ojajarvi *et al.*, 2000).

Casamentos consanguíneos aumentam o risco de gerar filhos homozigotos com frequências maiores do que os não-consanguíneos, por isso também aumentam o risco de doenças recessivas (Mitchell *et al.*, 2002; Kanaan *et al.*, 2008). Verifica-se que, além dos genes e fatores ambientais, a consanguinidade também está relacionada ao desenvolvimento de FL/PNS e outras anomalias congênitas como a hidrocefalia e a polidactilia (Stoltenberg *et al.*, 1999; Melve *et al.*, 2008; Ravichandran *et al.*, 2012). As taxas de consanguinidade variam consideravelmente entre países e culturas. Estudo epidemiológico e genético com 207 casos de FL/PNS realizado na França mostrou que 3,9% dos pacientes possuíam histórico de consanguinidade de primeiro grau entre os pais, sugerindo uma associação positiva entre consanguinidade e FL/PNS. Em outro estudo realizado no Teerã, 25 casos de FL/PNS foram registrados em um período de 8 anos, sendo que 31,8% dos mesmos foram provenientes de casamentos consanguíneos, enquanto que no grupo de crianças sem FL/PNS, apenas 8% foram provenientes de casamentos consanguíneos (Jamilian *et al.*, 2007). Liascovich *et al.* (2001) avaliaram uma amostra de 54.000 nascidos vivos em países da América do Sul entre 1967 e 1996 e identificaram uma taxa de consanguinidade de 0,96%. No Brasil a taxa observada foi de 1,6% e o Paraná teve a taxa de 1,79%. Leite & Koifman (2009), estudando um grupo de 274

pacientes com fissura oral, observaram que a consanguinidade esteve significativamente mais associada à FL/P (4%) que o observado na população controle. Este dado não se repetiu para a FP. Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul por Sandrini (2010) foi observado a presença de consanguinidade em 10% da amostra. No estudo de Aquino *et al.* (2011), dos 246 casos de pacientes fissurados, 15 pacientes (6,1%) apresentavam histórico de consanguinidade. No estudo de Souza & Raskim (2011) a consanguinidade esteve presente em 2,9% da amostra. No presente estudo, apenas 9 (4,6%) casais apresentaram história de consanguinidade, sendo a maioria com parentesco de terceiro grau, dados semelhantes aos achados de Calzolari *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008 que também não observaram a associação de consanguinidade e FL/PNS.

Em relação a ocorrência de abortos prévios, apenas 13 (6,7%) relataram ter ocorrido e 5 (2,6%) tiveram filhos natimortos. Um estudo recente realizado por Lin *et al.* (2014), que analisou 479 famílias chinesas, verificou a incidência de histórico de aborto em 96 (20%) das famílias, enquanto no grupo controle a incidência foi de 31 (6,5 %) dos casos. O mesmo estudo apontou que a presença de um indivíduo fissurado na família, e também a história prévia de aborto ou natimorto, devem ser considerados sinais de alerta para um maior risco de nascer um filho com fissura orofacial, sendo que múltiplas medidas preventivas devem ser tomadas, incluindo suplementação com ácido fólico no período pré-concepcional, esperar um tempo maior entre uma gestação e outra e evitar a exposição a agentes toxicogênicos como fumo, álcool, drogas e outras substâncias agressivas ao embrião (Martelli *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014).

6.3. Participação dos polimorfismos em genes de reparo do DNA na FL/PNS

Cada vez mais tem aumentado o interesse no estudo das variações do genoma humano e a sua influência no aparecimento das doenças. Pelo fato das FL/PNS representarem um dos defeitos congênitos mais frequentes, nos últimos anos inúmeros estudos têm colaborado para um avanço significativo no estudo e

compreensão da sua etiologia genética (Birnbaum *et al.*, 2009; Stuppia *et al.*, 2012; Ludwig, 2012; Böhmer *et al.*, 2013). Enquanto muitas alterações sindrômicas apresentam padrões mendelianos de herança e, portanto, são passíveis de caracterização genética (identificação do gene causador) (Murray *et al.*, 2002, Zuccheri *et al.*, 2004), estudos têm revelado que a etiologia das FL/PNS segue um padrão multifatorial, com a contribuição tanto de aspectos genéticos quanto dos fatores ambientais. Muitos genes e regiões cromossômicas são conhecidos atualmente, mas ainda estamos longe de uma completa compreensão da etiologia das FL/PNS. Muito se deve ao fato de que as FL/PNS são geneticamente heterogêneas, e pouco se conhece sobre a influência dos fatores ambientais na modulação dos genes envolvidos na formação do lábio e do palato (Lidral *et al.*, 2008). Em adição, a distribuição dos polimorfismos e haplótipos bem como suas correlações com as FL/PNS, variam amplamente entre as diferentes populações, fazendo com que estudos de validação de suscetibilidade, e associação de polimorfismos genéticos, sejam essenciais para aumentar a nossa compreensão da complexidade desta doença de origem multifatorial (Filézio *et al.*, 2013; Paranaíba *et al.*, 2013; Aquino *et al.*, 2014). Os polimorfismos genéticos são variações na sequência do DNA, comumente a alteração em uma única base (polimorfismo de nucleotídeo único, *single nucleotide polymorphism* - SNP), que podem estar associados a diversas doenças (Harms, 2004; Mocellin, 2009). Para ser caracterizado como um polimorfismo genético, o alelo variante tem que ser encontrado em, pelo menos, 1% da população.

Muitas alterações no DNA são causadas por agentes mutagênicos endógenos, incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como estão associadas a erros originados do processo de replicação, recombinação ou do próprio reparo em si. Entretanto, diversas alterações são resultantes da interação do DNA com uma variedade de compostos exógenos de natureza física, química ou biológica, sendo que muitos dos quais estão presentes no ambiente, onde pode haver exposição contínua (Jelonek *et al.*, 2010). Uma vez alterado o DNA, as células humanas dispõem do sistema de reparo que é capaz de garantir a

integridade do genoma e remover as bases inapropriadamente criadas ou alteradas, trocando-as por bases preexistentes, e ainda são capazes de manter a integridade da dupla hélice que pode ter sido comprometida. O objetivo principal deste sistema, composto por mais de uma centena de genes/proteínas, é de evitar a permanência e a transmissão do erro às células filhas, após a reprodução do material genético (Lindahl *et al.*, 1999). Contudo, variantes polimórficas nestes genes foram associadas com uma menor efetividade na capacidade de reparo, aumentando a probabilidade de manutenção do dano na molécula de DNA (Minamoto *et al.*, 1999; Goode *et al.*, 2002; Mocellin *et al.*, 2009).

O presente estudo avaliou a associação de 12 polimorfismos, contidos em 8 genes do reparo do DNA na suscetibilidade para o desenvolvimento das FL/PNS. Interessantemente, todos estes polimorfismos genéticos foram associados com uma menor efetividade no reparo quando da presença de uma alteração no DNA (Au *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2006; Shiokawa *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2008; Bravard *et al.*, 2009; Zaremba *et al.*, 2009; Krupa *et al.*, 2010; He *et al.*, 2013). Os resultados deste estudo revelaram que o polimorfismo rs3213245 do gene *XRCC1* foi significativamente associado a FL, enquanto o polimorfismo rs13181 do gene *ERCC2* demonstrou uma tendência de associação com as FLPs. Em relação a análise dos haplótipos, o haplótipo formado pelos polimorfismos rs25487, rs25489, rs321345 e rs1799782 no gene *XRCC1* demonstrou uma tendência de associação com FL/PNS, enquanto a presença deste mesmo haplótipo demonstrou uma associação significativa no grupo das FLs.

Para análise dos polimorfismos foi utilizado uma ferramenta de análise que vem ganhando cada vez mais popularidade na área de epidemiologia genética e é conhecida como TDT, pois se baseia tanto em informação de ligação como no desequilíbrio, que são subjacentes à associação. Para atender aos pré-requisitos deste tipo de teste, indivíduos afetados por FL/PNS, e seus progenitores, foram selecionados. Para o teste ser informativo, pelo menos um dos progenitores tem que ser heterozigoto para o locus (Feitosa & Krieger, 2002). A principal vantagem deste teste está no fato de ele não estar sujeito aos efeitos de estratificação

populacional, evitando a ocorrência de vieses, principalmente no que diz respeito à seleção da amostra (Santos *et al.*, 2002). Para análise dos dados, um conceito importante utilizado foi o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Ele prevê que, em uma população numerosa e que atenda às condições de equilíbrio (ausência de seleção, mutação, migração, entre outras), as frequências alélicas e genotípicas permanecem inalteradas ao longo de gerações de acasalamentos aleatórios. Segundo este modelo, se p é a frequência do alelo “A” e q a do alelo “a” de um dado locus bialélico, a frequência esperada no equilíbrio para os genótipos AA, Aa e aa será p^2 , $2pq$ e q^2 , respectivamente, sendo $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ e $p + q = 1$ (Beiguelman, 1994).

O polimorfismo rs3213245 no gene *XRCC1* é associado com uma menor interação da proteína XRCC1 com outras enzimas do sistema de reparo do DNA por BER, alterando a eficácia deste sistema (Saadat & Ansari-Lari, 2008). Em nosso estudo o polimorfismo rs3213245 revelou uma transmissão preferencial do alelo C e uma associação significativa com FL. Nenhum estudo anterior avaliou a associação do polimorfismo rs3213245 com FL/PNS. Contudo, um estudo prévio verificou que o polimorfismo rs25489 neste mesmo gene possuía um risco diminuído para o desenvolvimento de FL/PNS (Olshan *et al.*, 2005). Recentemente, os estudos de Wang *et al.* (2014) e Hou *et al.* (2002) encontraram uma relação do polimorfismo rs3213245 com câncer de pulmão, mas os estudos de Sei *et al.* (2007) e Osório *et al.* (2011) não conseguiram confirmar relação com cânceres de bexiga e mama, respectivamente.

A alteração provocada pelo polimorfismo rs13181 no gene *ERCC2* influencia a atividade da proteína e altera a capacidade de reparo do DNA pelo mecanismo por NER. Alguns estudos sugerem que as alterações deste polimorfismo na atividade proteica podem estar associadas a um aumento na frequência de aberrações cromossômicas (Lunn *et al.*, 2000; Spitz *et al.*, 2001; Benhamou *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2002; Au *et al.*, 2003). Dos registros mais recentes que abordam este polimorfismo destacam-se alguns estudos de meta análise confirmando a associação do polimorfismo com alguns tipos de neoplasias

como o câncer de boca (Zhang *et al.*, 2013), câncer gástrico (Yin *et al.*, 2013) e câncer de mama (Qiu *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2014). Contudo, nenhum estudo prévio verificou a suscetibilidade do polimorfismo rs13181 com o risco de FL/PNS.

Em resumo, nossos resultados demonstram pela primeira vez o envolvimento dos polimorfismos rs3213245 no gene *XRCC1* e rs13181 e possivelmente no gene *ERCC2* na patogênese da FL/PNS. Nossos resultados devem incentivar outros estudos, principalmente com amostras maiores, para aumentar a nossa compreensão e conhecimento dos eventos genéticos que contribuem para esta doença complexa. É importante destacar que os resultados obtidos nas investigações de polimorfismos genéticos apresentam resultados bastante controversos, com alguns estudos demonstrando forte associação e outros demonstrando pouca ou nenhuma associação. Esta falta de consenso pode ser o resultado de diferenças genéticas (influenciadas principalmente pelas diferentes origens étnicas), ação de fatores ambientais ou amostras insuficientes.

7 CONCLUSÕES

1. A avaliação epidemiológica revelou que os homens leucodermas foram os mais frequentemente afetados por FL/PNS na região oeste do estado do Paraná. Em adição, FLP foi o subtipo mais frequente, seguido por FL e FP.

2. Exposição a fatores de risco ambiental durante os primeiros meses de gestação como o tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, uso de medicamentos, foram frequentemente observados nos pais dos pacientes com FL/PNS.

3. Mais de 80% das mães entrevistadas relataram que não fizeram uso de suplementos vitamínicos durante o primeiro trimestre de gestação.

4. Dentre as alterações sistêmicas encontradas nos pacientes com fissura, alterações otorrinolaringológicas e respiratórias foram as mais prevalentes. As alterações otorrinolaringológicas foram significativamente mais frequentes em FPs, em comparação com FLs.

5. O alelo C do polimorfismo rs3213245 no gene *XRCC1* demonstrou uma transmissão preferencial dos genitores para o filho afetado, revelando ser um possível fator de risco o desenvolvimento de FLs.

6. O haplótipo G-G-T-C formado pelos polimorfismos rs25487, rs25489, rs321345 e rs1799782 no gene *XRCC1* foi significativamente associado com FLs.

7. O polimorfismo rs13181 do gene *ERCC2* demonstrou uma tendência de associação com FLP, sugerindo que o alelo de risco G pode ser um fator risco para o desenvolvimento de FLP não-sindrômica na população brasileira.

8. Os polimorfismos rs1136410 no gene *ADPRT*, rs1052133 no gene *OGG1*, rs1800734 no gene *MLH1*, rs1130409 no gene *APEX1*, rs861539 no gene *XRCC3*, rs1801321 no gene *RAD51*, rs25487, rs25489, e rs1799782 no gene *XRCC1* e rs1799793 no gene *ERCC2* não demonstraram uma associação significativa com FL/PNS na população brasileira estudada.

REFERÊNCIAS

- Abdo R, Machado M, editores. Odontopediatria nas fissuras labiopalatais. São Paulo: Santos; 2005.
- Agaçhan B, Küçük Hüseyin O, Aksoy P, Turna A, Yaylim I, Görmüş U, Ergen A, Zeybek U, Dalan B, Isbir T. Apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1) gene polymorphisms and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. *Anticancer Res.* 2009; 29(6): 2417-20.
- Al Omari F, Al Omari IK. Cleft lip and palate in Jordan: birth prevalence rate. *Cleft Palate-Cran J.* 2004; 41(6): 609-12.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. editores. *Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland Science, 2002.
- Andrew AS, Karagas MR, Nelson HH, Guarrera S, Polidoro S, Gamberini S, Sacerdote C, Moore JH, Kelsey KT, Demidenko E, Vineis P, Matullo G. DNA repair polymorphisms modify bladder cancer risk: a multifactor analytic strategy. *Hum Hered.* 2008; 65(2): 105-18.
- An Y, Jinb G, Wangc H, Wanga Y, Liua H, Lia R, WangaH, Qiana J, Sunc W, Wangc Y. Polymorphisms in hMLH1 and risk of early-onset lung cancer in a southeast Chinese population. *Lung Cancer- J Iaslc.* 2008; 59(2): 164-70.
- Antoniou AC, Sinilnikova OM, Simard J, Léoné M, Dumont M, Neuhausen SL, Struewing JP et al. RAD51135G/C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. *Am J Hum Genet.* 2007; 81(6): 1186-200
- Aquino SB, Paranaíba LMR, Martelli DRB, Swerts MSO, Barros LM, Bonan PRF, Martelli Júnior H. Study of patients with cleft lip and palate with consanguineous parents. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011; 77(1): 19-23.
- Aquino SN. Avaliação de novos polimorfismos nos genes TGF3, MSX1, MYH9 e JAG 2 em pacientes com fissuras lábio- palatinas não sindrômicas[mestrado]. Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2011.
- Aquino SN, Messetti AC, Bagordakis E, Martelli-Júnior H, Swerts MS, Graner, E, Coletta RD. Polymorphisms in FGF12, VCL, CX43 and VAX1 in Brazilian patients with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *BMC Med Genet.* 2013; 14 (53): 1-9.

Aquino SN, Hoshi R, Bagordakis E, Pucciarelli MGR, Messetti AC, Moreira HSB, Bufalino A, Borges A, Rangel ALCA, Brito LA, Swerts MSO, Martelli-Júnior H, Line SR, Graner E, Reis SRA, Passos-Bueno MR, Coletta RD. MTHFR rs2274976 polymorphism is a risk marker for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin and Mol Teratol.* 2014; 100: 30-35.

Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH: Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(15): 1843-50.

Austin MP, Mitchell PB. Psychotropic medications in pregnant women: treatment dilemmas (structured abstract). *Med J Austrália.* 1998; 169(8): 428-31.

Badovinac RL, Werler MM, Williams PL, et al. Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007; 79 (1): 8-15.

Bagordakis E, Parnaíba LMR, Brito LA, Aquino SN, Messetti AC, Martelli JH, Graner E, Bueno MR, Coletta RD. Polymorphisms at regions 1p22.19 (rs560426) and 8q24(rs1530300) are risk markers for nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Am J Med Genet A.* 2013; 161(5): 1177-80.

Baptista EVP, Leal GFL. Malformações congênitas associadas à fissura labial e/ou palatal em pacientes atendidos em um serviço de referência para tratamento de defeitos da face: um estudo de série de casos [mestrado]. Recife: Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira; 2007.

Barbosa MM, Rocha CM, Katina T, Caldas M, Codorniz A, Medeiros C. Prevalence of congenital heart diseases in oral cleft patients. *Pediatr Cardiol.* 2003; 24(4): 369-74.

Baroneza JE, Kausne MJSS, Carneiro H, Val JL, Oliveira JC. Dados epidemiológicos de portadores de fissuras labiopalatinas de uma instituição especializada de Londrina estado do Paraná. *Acta Sci Health Sci.* 2005; 27(1): 31-35.

Beaty TH; Wang H, Hetmanski JB et al. A case –control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Ann epidemiol.* 2001; 11(6): 434-42.

Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, Liang KY, Wu T, Murray T, Fallin MD, Redett RA, Raymond G, Schwender H, Jin SC, Cooper ME, Dunnwald M, Mansilla MA, Leslie E, Bullard S, Lidral AC, et. al. A

genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet.* 2010; 42(6): 525-29.

Berger F, Vaslin L, Belin L, Asselain B, Forlani S, Humbert S, Durr A, Hall J. The impact of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in OGG1 and XPC on the age at onset of Huntington disease. *Mutat Res.* 2013. 755(2): 115-19.

Berra CM, Menck CFM. Estudos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em lesões oxidativas em células de mamífero. [doutorado]. São Paulo. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências biomédicas da USP. 2008.

Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LY, Gindler J et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med.* 1999; 341(20): 1485-90.

Bianchi F, Cianciulli D, Pierini A, Seniori CA, Congenital malformations and maternal occupation: a registry based case-control study. *Occup Environ Med.* 1997; (54): 223-28.

Bieche I, de Murcia G, Lidereau R. Poly(ADP-ribose) polymerase gene expression status and genomic instability in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1996; 2 (7): 1163-67.

Bille C, Skytthe A, Vach W, Knudsen LB, Andersen AMN, Murray JC, Christensen K. Parent's age and the risk of oral cleft. *Epidemiology.* 2005; 16(3):311-16.

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. *Am J Epidemiol.* 2005; 161(11): 1047-55.

Bing Zhang, Xiaohui Jiao, Limin Mao, Jie Xue. Maternal cigarette smoking and the associated risk of having a child with orofacial clefts in China: A case control study *J Cran Maxillo Facial Surg.* 2011; 39 (3): 313-18.

Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M et al. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2009; 41(4): 473-77.

Blanco R, Chakraborty R, Barton SA, et al. Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. *Hum Biol.* 2001; 73(1): 81-9.

Böhmer AC, Magold E, Tessmann, Mossey PA, Theunissen RPS, Lindemans J, Marieke BB, Michele R et al., Analysis of susceptibility loci for Nonsyndromic

Orofacial clefting in a European Trio Sample. 2013; *Am Med Genet Part A* 161(10): 2545-49.

Bobola MS, Kolstoe DD, Blank A; Chamberlain MC, Silber JR. Repair of 3-methyladenine and abasic sites by base excision repair mediates glioblastoma resistance to temozolomide. *Front Oncol.* 2012; 2: 176-82.

Boiteux S, Radicella JP. Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie.*1999; 81: 59-67.

Boiteux S, Radicella JP. The Human OGG1 Gene: Structure, Functions, and Its Implication in the Process of Carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 377 (1): 1-8.

Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LY, Gindler J et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med* 1999; 341 (20): 1485–90.

Boorman CJ, Shimeld SM. The evolution of left-right asymmetry in chordates. *Bioessays.* 2002; 24(11): 1004-11.

Boulet SL, Grosse SD, Honein MA, Correa-Villasenor A. Children with orofacial clefts: health care use and costs among a privately insured population. *Public Health Rep.* 2009; 124 (3): 447-53.

Boyles A; Ballard JL Gorman DR; McConnaughey, Cabrera RM, Wilcox AJ, Lie T, Finnell RH Association between inhibited binding of folic acid to folate receptor a in maternal serum and folate-related birth defects in Norway. *Human Reproduction.* 2011; 26(8): 2232–38.

Bravard A, Vacher M, Moritz E, Vaslin L, Hall J, Epe E, Radicella JP. Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity, *Cancer Res.* 2009; 69 (8): 3642-49.

Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, Fitz-Patrick D. A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality - and tolerance of segmental aneuploidy - in humans. *Am J Hum Genet.* 1999; 64 (6): 1702-08.

Brito LA, Paranaiba LMR, Bassi CFS, Masotti C, Malcher C, Schlesinger D et al. Region 8q24 is a susceptibility locus for nonsyndromic oral clefting in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012; 94(6): 464-68.

Broder HL, Richman LC, Matheson PB. Learning disability, school achievement, and grade retention among children with cleft: a two-center study. *Cleft Palate Craniofac J*. 1998; 35(2): 127-31.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999; 234:177–186.

Bufalino A, Paranaíba LMR, Aquino SN, Martelli-Junior H, Swerts MSO, Colleta RD. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010; 88(11): 775-80.

Bunduki V, Ruano R, Sapienza AD, Hanaoka BY, Zugaib M. Diagnóstico pré-natal de fenda labial e palatina: experiência de 40 casos. *Rev Bras de Ginecol Obstet*. 2001; 23(9): 561-66.

Butali A, Suzuki S, Cooper ME, Mansilla AM, Cuenco K, Leslie EJ, Suzuki Y 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 CL(P). *Am J Med Genet Part A*. 2013; 161A(5): 965-72.

Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24 (22): 4387-94.

Caldecott KW, Shinohara A, Ogawa T. Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature*. 1998; 391 (6665): 404-7.

Caldecott KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair*. 2003; 2(9): 955-69.

Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet*. 2008; 9(8): 619-31.

Calzolari E, Pierini A, Astolfi G, Bianchi F, Neville AJ, Rivieri F. Associated anomalies in multi-malformed infants with cleft lip and palate: an epidemiologic study of nearly 6 million births in 23 Eurocat registries. *Am J Med Genet* 2007; 143(6): 528–37.

Campbell PT, Curtin K, Ulrich CM, Samowitz WS, Bigler J, Velicer CM, Mismatch repair polymorphisms and risk of colon cancer, tumour microsatellite instability and interactions with lifestyle factors. *Gut*. 2009; 58 (5): 661-7.

Cannavo E, Gerrits B, Marra G, Schlapbach R, Jiricny J. Characterization of the interactome of the human MutL homologues MLH1, PMS1, and PMS2. *J Biol Chem*. 2007; 282 (5): 2976–86.

Capellá G, Pera G, Sala N, Agudo A, Rico F, Del Giudicce G, Plebani M, Palli D et al. DNA repair polymorphisms and the risk of stomach adenocarcinoma and severe chronic gastritis in the epic-eurgast study. *Int J Epidemiol*. 2008; 37(6): 1316-25.

Capelozza FL, Silva FOG, Fissuras lábio-palatais. In: Petrelli E. *Ortodontia para fonoaudiologia*. São Paulo: Lovise.1994; 197-32.

Carmichael SL & Shaw GM. Maternal Corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies. *American Journal of Medical Genetics*.1999; 86 (3): 242-44.

Carmichael SL, Nelson V, Shaw GM, Wasserman CR, Croen LA. Socio economic status and risk of conotruncal heart defects and orofacial clefts. *Pediatr Perinat Epidemiol*. 2003; 17 (3): 264-71.

Carmichael SL, Shaw GM, Yang W, Abrams B, Lammer . Maternal stressful life events and risks of birth defects. *Epidemiol*. 2007; 18(3): 356-61.

Carmichael SL, Ma C, Tinker S, Rasmussen SA, Shaw GM; Maternal Stressors and Social Support as Risks for Delivering Babies with Structural Birth Defects. *Pediatr Perinat. Epidemiol*.2014; 28 (6): 338-44.

Cassell CH, Meyer R, Daniels J. Health care expenditures among Medicaid enrolled children with and without orofacial clefts in North Carolina, 1995–2002. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008; 82 (11): 785-94.

Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Léger J, Lyonnet S et al. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet* . 2002; 11(17): 2051-59.

Castilla EE, Orioli IM. ECLAMC: the Latin-American collaborative study of congenital malformations. *Community Genet*. 2004; 7: (2-3) 76-94.

Castilla E, Camelo LJS, Paz JAE, Orioli. *Prevenção primaria de los defectos congénitos*. Rio de Janeiro: Fiocruz. 1996; 71-93.

Cejka, P, Stojic L, Mojas N, Russell AM, Heinimann K, E Cannavo, Pietro M, Marra G, Jiricny J. Methylation induced G(2)/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *Embo J*. 2003; 22(9): 2245- 54.

Chacko P, Rajan B, Joseph T, Mathew PS, Pillai MR. Polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 and increased genetic susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2005; 89 (1): 15-21.

Chang JS, Selvin S, Metayer C, Crouse V, Golembesky A, Buffler PA: Parental smoking and the risk of childhood leukemia. *Am J Epidemiol*. 2006; 163(12): 1091-100.

Chen L, Elahi A, Pow-Sang J, Lazarus P, Park J. Association between polymorphism of human oxoguanine glycosylase 1 and risk of prostate cancer. *J Urol*. 2003; 170(6): 2471-4.

Chen,F., Arseven,O.K. and Cryns,V.L.Proteolysis of the mismatch repair protein MLH1 by caspase-3 promotes DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2004; 279 (26): 27542-48.

Cheng YT, Wang Y, Urena ED, Kumar S, Chen J. Heterology tolerance and recognition of mismatched base pairs by human Rad51 protein. *DNA Repair*. 2011; 10: 363-72.

Chen Q, Wang H, Hetmanski JB, Zhang T, Ruczinski I. Was Associated with NSCL/P in an Asian Population. 2012; 7(4): 39-47.

Chen WC, Tsai CW, Hsia TC, Chang WS, Lin LY, Liang SJ, Tu CY, Cheng WE, Chen HJ, Wang SM, Baud T. The contribution of DNA apurinic/ apyrimidinic endonuclease genotype and smoking habit to Taiwan lung cancer risk. *Anticancer Res*. 2013; 33(6): 2775–8.

Chen YT, Chen SY, Lin YJ, Huang CM, Chang YY, Tsai FJ. Association between XRCC3 Thr241Met SNP and systemic lupus erythematosus in Han Chinese patients in Taiwan, and a meta-analysis of healthy populations.*J Clin Lab Anal*. 2014; 28(2): 118-23.

Chevrier C, Bahuau M, Perret C, Iovannisci DM, Nelva A, Herman C, et al. Genetic susceptibilities in the association between maternal exposure to tobacco smoke and the risk of nonsyndromic oral cleft. *Am J Med Genet A*. 2008; 146(18): 2396-406.

Christensen K, Mortensen PB. Facial clefting and psychiatric diseases: a follow-up of the Danish 1936-1987 Facial Cleft cohort. *Cleft Palate Craniofac J*. 2002; 39 (4): 392-96.

Christensen K, Juel K, Herskind AM, Murray JC. Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. *BMJ*. 2004; 328 (7453): 1405.

Chung KC, Kowalski CP, Kim HM, Buchman SR: Maternal cigarette smoking during pregnancy and the risk of having a child with cleft lip/palate. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 105(2): 485-91.

Clarkson SG, Wood RD. Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: An appraisal *DNA Repair.* 2005; (10): 1068-74.

Cleaver JE, Lam ET, Revet I (2009) Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and a molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet.* 2009; 10(11): 756-68.

Cohen MMJ. Malformations of the craniofacial region: evolutionary, embryonic, genetic, and clinical perspectives. *Am J Med Genet.* 2002; 30; 115(4): 245-68.

Cornetta T, Patrono C, Terrenato I, De Nigris F, Bentivoglio AR, Testa A, Palma V, Poggioli T, Padua L, Cozzi R. Epidemiological, clinical, and molecular study of a cohort of Italian Parkinson disease patients: association with glutathione-S-transferase and DNA repair gene polymorphisms. *Cell Mol Neurobiol.* 2013; 33(5): 673-80.

Costa RM, Chigancas V, Galhardo Rda S, Carvalho H, Menck CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.* 2003; 85(11): 1083–99.

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. *Rev Bras Matern Infant.* 2009; Recife 9(2): 149-56.

Cunha EM, Fontana R, Fontana T, Silva WR, Moreira QVP, Garcias GL, Roth MGM. Antropometria e fatores de risco em recém-nascidos com fendas faciais. *Rev Bras Epidemiol.* 2004; 7(4): 417-22.

Czeizel AE, Hirschberg J. Orofacial clefts in Hungary. Epidemiological and genetic data, primary prevention. *Folia Phoniatr. Logop Basel.* 1997; 49(3-4): 111-16.

Czeizel AE, Timar L, Sarkozi A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics.* 1999; 104(6): 66-74.

Czerninki R. Promoter hypermethylation of mismatch repair gene, MLH1 and MLH2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2009; 15(3): 206-13.

Darwin C. The variation of animals and plants under domestication. London, England: John Murray. 1875.

De Boer J, Hoeijmakers JH. Cancer from the outside, aging from the inside: mouse models to study the consequences of defective nucleotide excision repair. *Biochimie*. 1999; 81(1-2): 127-37.

De Boer J, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 2000; 21(3): 453-60.

De Fazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo J*. 2002; 21(12):3192-200.

De Laat, WL.; Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*. 1999; 13(7): 768-85.

De Roo LA, Wilcox AJ, Drevon CA, Lie RT. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol*. 2008; 168(6): 638-46.

De Ruyck K et al. Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. *Mutat Res*. 2007; 631(2):101-10.

Deng DJ, Zhou J, Zhu BD, et al. Silencing-specific methylation and single nucleotide polymorphism of hMLH1 promoter in gastric carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2003; 9(1): 26-9.

Desrosiers TA, Lawson CC, Meyer RE, Richardson DB, Daniels JL, Waters MA, et al. National Birth Defects Prevention Study. Maternal occupational exposure to organic solvents during early pregnancy and risks of neural tube defects and orofacial clefts. *Occup. Environ Med*. 2012; 69(7): 493-39.

Dietz A, Pedersen DA, Jacobsen R, Wehby GL, Murray JC, Christensen K. Risk of breast cancer in families with cleft lip and palate. *Ann Epidemiol*. 2011; 22: 37-42.

Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC: Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011; 12 (3): 167-78.

Duarte R, Leal MJ. Leque das malformações congênitas associadas às fissuras lábio alvéolo palatinas. *Acta Medica Portuguesa*. 1999; 12: (4-6): 147-54.

Dusinska M, Džupinkova Z, Wsolova I, Harrington V, Collins AR. Possible involvement of XPA in repair of oxidative DNA damage deduced from analysis of damage, repair and genotype in a human population study. *Mutagenesis*. 2006; 21(3): 205-11.

Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TD, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of

DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*.2000; 21:965–971.

Elahi MM, Jackson IT, Elahi O, Khan AH, Mubarak F, Tariq GB, et al. *Epidemiology of cleft lip and palate in Pakistan. Plast Reconstr Surg.* 2004; 113 (6): 1548-55.

El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31 (19): 5526-33.

Emanuel I, Culver BH, Erickson JD. The further epidemiological differentiation of cleft lip and palate: a population of clefts in King County Washington, 1956-1965. *Teratology.* 1973; 7(3): 271-81.

Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR, Goings APE. Overexpression of XPC-hHR23B. *Mutation Research.* 2000; 461 (2): 83-108.

Fan F, Liu C, Tavares S, Arnheim N. Polymorphisms in the human DNA repair gene XPF. *Mutat Res.* 1999;406:115–120.

Feitosa MF, Krieger H. O futuro da epidemiologia genética de características complexas. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2002; 7: 73-83.

Fousteri M, Mullenders LH. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 2008; 18(1): 73-84

Filézio MR, Pinto EB, Aquino SN, Martelli-Júnior H, Swerts MSO, Graner E, Coletta RD, Paranaíba LVM. Polymorphisms in and Oral Clefting in the Brazilian Population. *DNA Cell Biol.* 2013; 32(3): 125-29.

Finnell, RH, Greer KA, Barber, RC, Piedrahita J A. Neural tube and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes. *Crit Rev Oral Bio Med* 1998; 9(1): 38-53.

Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT. et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability *Cancer Res.*1999; 59(5): 1090–95.

Fogh Andersen P. Inheritance of harelip and cleft palate. Copenhagen, Denmark: Munksgaard. 1942.

Fonseca EP, Rezende JRV. Incidência das malformações do lábio e do palato. *Rev. Fac. Odontol. São Paulo.* 1971; (9): 45-58.

França CMC, Locks A. Incidência das fissuras lábio-palatinas de crianças nascidas na cidade de Joinville (SC) no período de 1994 a 2000. *J Bras Ortodon Ortop Facial*. 2003; 8(47): 429-36.

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. *J Med Genet*. 2006; 43: 138-42.

Freitas JA, Dalben G da S, Santamaria M Jr, Freitas PZ. Current data on the characterization of oral clefts in Brazil. *Braz Oral Res*. 2004; 18(2): 128-33.

Freitas e Silva DS, Maruo LDL, Oliveira LB, et al. Estudo descritivo de fissuras lábio-palatinas relacionadas a fatores individuais, sistêmicos e sociais. *Revista Gaúcha de Odontologia*. 2008; 56(4): 387-91.

Freitas JAS, Neves LT, Pompéia AL, Almeida F, Garib BG, Suedam IKT, Yaedú RKF, Carvalho RCM et al. Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies/USP (HRAC/USP) – Part 1: Overall Aspects. *J Appl Oral Sci*. 2012; 20(1): 9-15.

Freitas, JAS, et al. Current data on the characterization of oral clefts in Brazil. *Braz Oral Res*. 2004; 18(2): 128-33.

Garcia AM, Fletcher T, Maternal occupation in the leather industry and selected congenital malformation. *Occup Environ Med*. 1998; 55(2): 284-6.

Garcia AM. Occupational Exposures and Congenital Malformations: A Critical Review. *Frontiers in Fetal Health*. 2000; 2(9): 11-12.

Gardenal M, Bastos PRHO, Pontes ERJC, Bago D. Prevalência das Fissuras Orais diagnosticadas em um serviço de referencia em casos residentes no estado do Mato Grosso do Sul. *Arquivos Int. de Otorrinolaringologia* 2001; 15(2): 133-41.

Garlantezec, R, Monfort, C, Rouget, F, Cordier, S Maternal occupational exposure to solvents and congenital malformations: a prospective study in the general population. *Occup Environ Med*. 2009; 66(7): 456-63.

Genisca AE, Frias JL, Broussard CS, et al. Orofacial clefts in the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2004. *Am J Med Genet A*. 2009; 149A(6): 1149-58.

Ginsberg G, Angle K, Guyton K, Sonawane B. Polymorphism in the DNA repair enzyme XRCC1: utility of current database and implications for human health risk assessment. *Mutat Res*. 2011; 727(1-2): 1-15.

Gong SG, Gong TW, Shum L. Identification of markers of the mid face. *J Dent Res*. 2005; 84(1): 69-72.

Gonzaga HFS, Jorge MA, Heck JF, Gonzaga LHS. Malformações da face de interesse para o pediatra - fissuras labiais e do palato. *Pediatria Atual*. 2001; 14(7): 53-58.

Gonzales R. MLH1 Promoter methylation is an early event in oral cancer. *Oral Oncol*. 2011; 47(1): 22-26.

González BS, LópezML, Rico MA, Garduño F. Oral clefts: a retrospective study of prevalence and predisposal factors in the State of Mexico. *J Oral Science* 2008; 50(2): 23-129.

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002; 11(12): 1513-30.

Gong SG, Gong TW, Shum L. Identification of markers of the midface. *J Dent Res*. 2005; 84 (1): 69-72.

Gordon JE, Shy CM. Agricultural chemical use and Congenital cleft lip and/or palate. *Archives of Environmental Health*.1981; 36(5): 213-21.

Gorlin R, Cohen M, Hennekam R. *Syndromes of the head and neck*. 4. ed. New York: Oxford University Press; 2001.

Gotoa T, Arakakia K, Toshimoto T, Nakamac J,Fujii A, Katashimab H, Zhub Sunakawa H. A retrospective study on familial occurrence of cleft lip and/or palatal.*Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. Medicine and Pathology* 2013; 25: 119-122.

Grant SF, Wang K, Zhang H,Glabeerson W, Annaiah K, Kim CE et al. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr*. 2009; 155(6): 909-13.

Griffin CS, Simpson PJ, Wilson CR, Thacker J. Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation. *Nat Cell Biol*. 2000; 2 (7): 757-61.

Grewal J, Carmichael SL, Ma C, Lammer EJ, Shaw GM Maternal periconceptional smoking and alcohol consumption and risk for select congenital anomalies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008; 82(7): 519-26.

Grosen D, Chevrier C, Skytthe 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. *J Med Genet.* 2010; 47(3): 162-8.

Gundlach KK, Maus C. Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world wide. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006; 2(1-2): 34

Gushima M, Hirahashi M, Matsumoto T, Fujita K, Fujisawa R, Mizumoto K, et al. Altered expression of MUTY H and an increase in 8-hydroxydeoxyguanosine re early events in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *J Pathol.* 2009; 219 (1): 77-86.

Hadi MZ, Coleman MA, Fidelis K, Mohrenweiser HW, Wilson DM: Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(20): 3871-79.

Han S, Zhang HT, Wang Z, Xie EY, Tang R, Mao Y, L I Y. DNA repair gene XRCC3 polymorphisms and cancer risk: a metaanalysis of 48 case-control studies. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14(10): 1136-44.

Hanawalt PC, Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(12): 958-70.

Harms C. Polymorphisms in DNA repair genes, chromosome aberrations, and lung cancer. *Environ Mol Mutagen* 2004; 44(1): 74-82.

Harville EW, Wilcox AJ, Lie TR, Vindenes H, Abynholm F. Cleft Lip and Palate versus Cleft Lip Only: Are They Distinct Defects? *American Journal of Epidemiology.* 2005; 126(5): 448-53.

Hasselbach L, Haase S, Fischer D, Kolberg HC, Sturzbecher HW. Characterisation of the promoter region of the human DNA-repair gene Rad51. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2005; 26: 589-98.

Hay S. Incidence of clefts and parental age. *Cleft Palate J.* 1967; 4(1): 205-13.

He Y, Xu X, Chen H, Wang J, Xiong W, Xu Y, Liu J. The hMLH1 promoter polymorphisms and cancer susceptibility in Asian populations: a meta-analysis. *Gene.* 2013; 523(2): 199-04.

Herkath AP, Herkath FJ, Rebelo MA, Vettore MV. Parental age as a risk factor for non-syndromic oral clefts: a meta-analysis. *J Dent.* 2011; 40(1): 3-14.

Hill DA, Gridley G, Cnattingius S, et al. Mortality and cancer incidence among individuals with Down syndrome. *Arch Intern Med* 2003; 163 (7): 705-11.

Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, Brown KK, Bruns GA, Donovan DJ et al. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. *Am J Hum Genet.* 2008; 82(9): 712-22.

Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001; 411(6835): 366-74.

Honein MA, Rasmussen SA Reefhuis J, Romitti PA, Lammer EJ, Sun L. Maternal Smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidmiology.* 2007; 18(2): 2226-33.

Hou SM, Falt S, Angelini S, Yang K, Nyberg F, Lambert B, Hemminki K: The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2002; 23(4): 599-03.

Hu D, Lin X, Zhang H, Zheng X, Niu W. APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 gene Asp148Glu polymorphism and cancer risk: a meta-analysis involving 58 articles and 48903 participants. *BMC Cancer PLoS One.* 2013; 12(8): 83527.

Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic Polymorphisms in the excision repair pathway and cancer risk: a huge review. *Am J Epidem.* 2005; 162(10): 925-42.

Huseyin Altunhan a, Ali Annagur ., Murat Konak a, Sabahattin Ertuğrul a, Rahmi Ors Hasan Koc. The incidence of congenital anomalies associated with cleft palate/cleft lip and palate in neonates in the Konya region, Turkey *British J Oral Maxillof.* 2012; 50(7): 541-44.

Ian P M, Tomlinson, Richard S, Houlston, Grant W. Montgomery, Oliver M Sieber. Investigation of the effects of DNA repair gene polymorphisms on the risk of colorectal cancer. *Mutagenesis.* 2012; 27(2): 219-23.

Ito, Y. Yanagisawa, Y. Iwahashi et al. A core promoter and a frequent single-nucleotide polymorphism of the mismatch repair gene hMLH1 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 256 (3): 488-94.

Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks *Carcinogenesis.* 2002; 23 (7): 687-96.

Jacobs AL, Schar P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma.* 2012; 121(1): 1–20.

Jacobsen NR, Raaschou-nielsen O, Nexø B, Wallin H, Overvad K, Jiao I. Selected polymorphisms of DNA repair genes and risk of pancreatic cancer. *Cancer Detection and Prevention*. 2004; 30: (1) 284-91.

Jamilian A, Nayeri F, Babayan A. Incidence of cleft lip and palate in Tehran. *J Indian Soc Pedod Prevent Dent*. 2007; 12(2): 174-6.

Jelonek K, Gdowicz-Klosok A, Pietrowska M, Borkowska M.;Korfanty J, Rzeszowska-Wolny, J.; Widlak, P. Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population. *J Appl Genet*. 2010; 51(3): 343-52.

Jensen BL, Kreiborg S, Dahl E, Fogh Andersen P. Cleft lip and palate in Denmark, 1976-1981: Epidemiology, variability, and early somatic development. *Cleft Palate J*. 1988; 25(3): 258-69.

Jha R; Gaur P; Sharma SC; Das SN. Single nucleotide polymorphism in hMLH1 promoter and risk of tobacco-related oral carcinoma in high-risk Asian Indians. *Gene*. 2013; 526(2): 223-27.

Jia ZL, Li Y, Li L, Wu J, Zhu LY, Yang C et al. Association among IRF6 polymorphism, environmental factors, and nonsyndromic orofacial clefts in western china. *DNA Cell Biol*. 2009; 28(5): 249-57.

Jia, ZL, Shi B, Chen CH, Shy JY, Wu J, Xu X. Maternal malnutrition, environmental exposure during pregnancy and the risk of non-syndromic orofacial clefts. *Oral Disease*. 2011; 17(6): 584-9.

Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: orphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn*. 2006; 235(5): 1152-66.

Jiayan L, Zeqiang G, Yongjuan C, Kaihong D, Bing D, Rongsheng L. Analysis of interactions between genetic variants of BMP4 and environmental factors with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate susceptibility. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 39(1): 50-6.

Jin f, Qian C, Qing Y, Zhang Z, Wang G, Shan J, Dai N , Li Z, Wang D. Genetic polymorphism of APE1 rs1130409 can contribute to the risk of lung cancer. *Tumor Biol*. 2014; 35(7): 6665-71.

Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol*. 2008; 37(5): 1041-58.

Jorde LB, Carey JCC, Bamshad MJ, White RL. Herança multifatorial e doenças comuns. *Genética Médica*. 3. ed. Rio de Janeiro. Elsevier. 2004; 285-18.

Jorgeson RJ, Pashayan HM. Cleft lip. In: Buyse ML. *Birth Defects Encyclopedia*. Dover: Blackwell Scientific Publications. 1990; 405-07.

Jugessur A, Farlie G, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis*. 2009; 15(7): 437-53.

Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev*. 2005; 15: 270-78.

Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, Christensen K, Boyles AL, Daack Hirsch S, Trung TN, Bille C, Lidral AC, Murray JC. Genetic determinants of facial clefting: Analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. *Plos One*. 2009; 4(4): 5385.

Juriloff DM, Harris MJ. Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008; 82(2): 63-77.

Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*. 2001; 27(3): 247-54.

Kang GH, Shim YH, Ro JY. Correlation of methylation of the hMLH1 promoter with lack of expression of hMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. *2 Lab Invest*. 1999; 79(7): 903-09.

Karran P. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2000; 10(4): 144-50.

Kelada NS, Eaton DL, Wang SS, Rothman NR, Khoury MJ. The Role of Genetic Polymorphisms in Environmental Health. *Environ Health Perspect*. 2003; 111(8): 1056-64.

Khoury MJ, James LM, Flanders D, Erickson JD. Interpretation of recurring weak associations obtained from epidemiologic studies of suspected human teratogens. *Teratology*, 1992; 46(9): 69-77.

Kimani JW, Shi M, Daack-Hirsch S, et al. X-chromosome inactivation patterns in monozygotic twins and sib pairs discordant for nonsyndromic cleft lip and/or palate. *Am J Med Genet A*. 2007; 143 (24): 3267-72.

Kinoshita H, Natsume N, Hara Y, Miura S, Hattori T, Kawai T. The incidence of cleft lip and/or palate in families. *POMS*. 1992; 2(1): 41-7.

Kobayashi GS, Alvizi L, Sunaga DY, Francis-West P, Kuta A, et al. Susceptibility to DNA Damage as a Molecular Mechanism for Non-Syndromic Cleft Lip and Palate. PLoS ONE. 2013; 8(6): 656-77.

Kohli SS, Kohli VS. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. J Oral Maxillofac Pathol. 2012; 16(1): 64-72.

Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y et al. Mutation in IRF6 cause van der Woude and popliteal pterygium syndromes. Nat Genet. 2002; 32(2): 285-89.

Kot M, Kruk-Jeromini J. Analysis of family incidence of cleft lip and/or palate. Med Sci Monit. 2007; 13(3): 231-34.

Kozer E, Nikfar S et al. Aspirin consumption during the first trimester of pregnancy and congenital anomalies: a meta-analysis. Amer J Obs and Gyn; 2002; 187(6): 1623-30.

Krapes IP, Vermeij-Keers C, Müller M, Klein A, Theunissen RPS. Nutrition and genes in the development of orofacial clefting. Nutrition Reviews. 2006; 64(6): 280-88.

Krokan HE, Drablos F, Slupphaug G. Uracil in DNA—occurrence, consequences and repair. Oncogene. 2002; 21(58): 8935–48.

Krupa R, Sliwinski T, Wisniewska-Jarosinska M, Chojnacki J, Wasylecka M, Dziki I, Morawiec J, Blasiak J. Polymorphisms in RAD51, XRCC2 and XRCC3 genes of the homologous recombination repair in colorectal cancer—a case control study. Mol Biol Rep. 2010; 38(4):150-58.

Kurumizaka H, Ikawa S, Nakada M., Eda K, Kagaw W, Takata M, Takeda S, Yokoyama S, and Shibata T. Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins XRCC3-RAD51C. Proc Natl Acad Sci 2001; 98: 5538–43.

Lammer EJ, Shaw GM, Iovannisci DM, Van Waes J, Finnell RH. Maternal Smoking and the risk of orofacial clefts: Susceptibility with NAT1 and NAT2 polymorphisms. Epidemiology. 2004; 15(2):150-6.

Lammer EJ, Shaw GM, Lovannisci DM, Finnell RH. Maternal smoking, genetic variation of glutathione s-transferases, and risk for orofacial clefts. Epidemiology. 2005; 16(5): 698-01.

Lary JM, Paulozzi LJ. Sex differences in the prevalence of human birth defects: a population-based study. Teratology. 2001; 64(5): 237-51.

Laumon B, Martin JL, Collet P, Bertucat I, Verney MP, Robert E. Exposure to organic solvents during pregnancy and oral clefts: a case-control study. *Reprod Toxicol.* 1996 Jan-Feb; 10(1): 15-9.

Lee BI, Wilson DM. The RAD2 domain of Human exonuclease 1 exhibits 5' to 3' exonuclease and flap structure-specific endonuclease activities. *The Journal of Biological Chemistry.* 1999; 274 (53): 37763-69.

Lehmann, A. R. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Hyperactivation and Increased Oxidative Stress. Genes Dev.* 2001; 15: 15-23.

Leite JCL, Sschüler-Faccini I. Defeitos congênitos em uma região de mineração de carvão. *Revista Saúde Pública.* 2001; 35(2): 136-41.

Leite IC, Paumgarttem FJR, Koifman S. Chemical exposure during pregnancy and oral clefts in newborns. *Cad. Saúde Pública.* 2002; 18(1): 17-31.

Leite IC, Paumgartten FJR, Koifman S. Fendas orofaciais no recém-nascido e o uso de medicamentos e condições de saúde materna: estudo caso-controle na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras. Saúde Matern. Infant. Recife* 2005; 5(1): 35-43.

Leite IC, Koifman S. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro. *Brazil. Braz Oral Res.* 2009; 23(1): 31-7.

Lennon CJ, Birkeland AC, Nunez JA, Su GH, Lanzano P, Guzman E, Celis K, Eisig SB, Hoffman D, Rendon MT, Ostos H, Chung WK, Haddad J Jr Association of candidate genes with nonsyndromic clefts in Honduran and Colombian populations. *Laryngoscope.* 2012; 122: (9) 2082-87.

Leslie EJ, Mansilla MA, Biggs LC, Schuette K, Bullard S, Cooper M, Dunnwald M, Lidral AC, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome wide association on chromosome 1p22. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012; 94(11): 934-42.

Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2013; 163(4): 246-58.

Leslie EJ, Murray JC. Evaluating rare coding variants as contributing causes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Clin Genet.* 2013; 84(5): 496-500.

Leslie JE, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012; 16(1): 64-72.

Leslie JE, Mansilla M, Biggs LC, Schuette K, Bullard S, Cooper M, Dunnwald M, Lidral J, Marazita M, Beaty TH, Murray JC. Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome wide association on chromosome 1p22. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012; 94(11): 934-42.

Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 2008; 18(1): 85-98.

Li Z, Liu J, Ye R, Zhang L, Zheng X, Ren A. Maternal passive smoking and risk of cleft lip with or without cleft palate. *Epidemiol.* 2010; 2: 240-42.

Li Z, Guan W, Li MX, Zhong ZY, Qian CY, Yang XQ, Liao L, Li ZP, Wang D. Genetic polymorphism of DNA base-excision repair genes (APE1, OGG1 and XRCC1) and their correlation with risk of lung cancer in a Chinese population. *Arch Medic Res.* 2011; 42(3): 226-34.

Li Y, Li S, Wu Z, Hu F, Zhu L, et al. Polymorphisms in genes of APE1, PARP1, and XRCC1: risk and prognosis of colorectal cancer in a northeast Chinese population. *Med Oncol.* 2013; 30(2): 505-10.

Li SX, Dai QS, Chen SX, Zhang SD, Liao XY, Deng X, Chi HB, Li FJ, Zhu JH, Jiang YY. Xeroderma pigmentosum complementation group D (XPD) gene polymorphisms contribute to bladder cancer risk: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014; 35(4): 3905-15.

Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, et al. Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997; 34(1): 1-6.

Lieber MR, Lu H, Gu J, Schwarz K. Flexibility in the order of action and in the enzymology of the nuclease, polymerases, and ligase of vertebrate non-homologous DNA end joining: relevance to cancer, aging, and the immune system. *Cell Res.* 2008; 18(1): 125-33.

Lieff S, Olshan AF, Werler M, Strauss RP, Smith J, Mitchell A. Maternal Cigarette Smoking during Pregnancy and Risk of Oral Clefts in Newborns. *Am J Epidemiology.* 1999; 150(7): 683-94.

Lima I, Aquino SN, Volpe FM, Martelli DRB, Swerts MSO, Paranaíba LMR, Martelli Júnior H. Prevalence of depressive symptoms in patients with cleft lip and palate. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2014; 80: ii-iii.

Lima WC, Medina SR, Galhardo RS, Menck CFM. Distribution of DNA repair-related in sugarcane. *Genet. Mol. Biol.* 2001; 24:141-146.

Lin y, Shu S, Tang S. A case-control study of environmental exposures for nonsyndromic cleft of the lip and/or palate in eastern Guangdong, China. *Int J Pedia Otorhinolaryngol.* 2014; 78(3): 45–51.

Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science* 1999; 286(5446): 1897-1905.

Lindemans J, Bouwman-Both M, Rubini M, Franceschelli P, Aiello V, Peterlin B, Lindahl T. Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat Res.* 2000; 462(2-3): 129-35.

Little J, Cardy A, Munger R G. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull. World Health Organ.* 2002; 82(3): 213-18.

Liu HP, Lin WY, Wu BT, Liu SH, Wang WF, Tsai CH, Lee CC, Tsai FJ. Evaluation of the poly(adp-ribose) polymerase-1 gene variants in Alzheimer's disease. *J clin lab anal.* 2010; 24(3): 182-6.

Lo YL, Hsiao CF, Jou YS, et al. Polymorphisms of MLH1 and MSH2 genes and the risk of lung cancer among never smokers. *Lung Cancer.* 2011; 72(7): 280-6.

Lockett KL, Hall MC, Xu J, Zheng SL, Berwick M, Chuang SC. The ADPRT V762A genetic variant contributes to prostate cancer susceptibility and deficient enzyme function. *Cancer Res.* 2004; 64(17): 6344-48.

Loffredo LCM, Freitas JAS, Grigolli AAG. Prevalência de fissuras orais de 1975 a 1994, Brasil. *Rev Saude Publica,* 2001; 35(6): 571-75.

Lopes VLGS, Caixeta JAS. Estudo retrospectivo da prevalência de fissuras labiais e lábio-palatais no serviço de genética clínica, Unicamp. *Anais: XIII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp.* 2006; 27-8.

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. *Am J Med Genet A.* 2010; 152(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 J Work Environ Health.* 2000; 26(2): 137-45.

Lorente C, Cordier S, Goujard J, Ayme S, Bianchi F, Calzolari E, De Walle HE, Knill-Jones R. Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. *Am J Public Health* 2000; 90: 415-419.

Lucsford et al. Coordination of MYH DNA glycosylase and APE1 endonuclease activities via physical interactions. *DNA Repair*. 2013; 8: 150-158.

Ludwig KU, Mangold E, Herms S, Nowak S, Reutter H, Paul A, Becker J, Herberz R, Alchawa T, Nasser E, Bohmer AC, Mattheisen M, Alblas MA, Barth S, Kluck N, Lauster C, et al. Genome wide meta analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nat Genet*. 2012; 44: 968-71.

Lunn RW, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA: XPD polymorphisms: effect on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 2000; 21(4): 551-55.

Magdalenic MM, Bagatin M. An epidemiological study of orofacial clefts in Croatia 1988-1998. *J Cranio Maxillofac Surg*. 2005; 33 (2): 85-90.

Malanga M, Althaus FR. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. *Biochem Cell Biol*. 2005; 83(3): 354-64.

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

Manuguerra M, Saletta M, Karagas F, Berwick MR, Veglia MR, Vineis F, Matullo G. XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2006; 164(4): 297-02.

Marazita ML, Goldstein AM, Smalley SL, Spence MA. Cleft lip with or without cleft palate: reanalysis of a three-generation family study from England. *Genet Epidemiol*. 1986; 3: 335-42.

Marazita M, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, McHenry TG, Cooper ME, 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. *Hum Hered*. 2009; 68(3): 151-70.

Marçano ACB, Doudney K, Braybrook C, Squires R, Patton MA, Lees MM, et al. TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate. *J Med Genet*. 2004; 41: 68-74.

Marció F. Conhecimento dos pais de crianças portadoras de fissuras lábiopalatais sobre a condição que afeta seus filhos. [bacharelado]. Cascavel- PR. 2006.

Martelli DRB, Bonan PR, Soares MC, Paranaíba LR, Martelli-Júnior H. Analysis of familial incidence of non-syndromic cleft lip and palate in a Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15(6): 898-01.

Martelli DRB, Cruz KW, Barros LM, Silveira M; Swert MSO, Martelli H Jr. Maternal and paternal age, birth order and interpregnancy interval evaluation for cleft lip-palate. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010; 76(1): 107-12.

Martelli DRB, Machado RA, Swerts MSO, Rodrigues, LAM, Martelli H Jr. Non syndromic cleft lip and palate: relationship between sex and clinical extension. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2012; 78(1): 116-20.

Martelli DRB, Vieira AR, Soares PM, Coletta RD, Martelli-Júnior H. Risk of nonsyndromic cleft lip and palate in relatives of women with breast cancer. *Am J Med Genet A.* 2014; 162(1): 270-1.

Martelli HJ, Orsi JJ, Freitas AB, Freitas JAS, Chaves M. Estudo epidemiológico das fissuras labiais e palatais em Alfenas, Minas Gerais, de 1986 a 1998. *Rev Pós-Grad Fousp.* 2006; 13: 31-35.

Martelli HJ, Porto LCVP, Barbosa, DR; Bonan PRF; Freitas, AB; Coletta, RD. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in Minas Gerais State, between 2000-2005. *Brazilian Oral Research.* 2007; 21(4): 314-17.

Martinez C, Cordeiro A; Priolli DG, Miranda DDC, Bartchewsky JW; Margarido NF, Ribeiro ML. Avaliação da Expressão Tecidual do Gene de Reparo MLH1 e dos Níveis de Dano Oxidativo ao DNA em Doentes com Câncer Colorretal. *Rev bras Coloproct.* 2009; 29(3): 303-313.

Masson JY, Tarsounas MC, Stasiak AZ, Stasiak A, Shah R, McIlwraith MJ, Benson FE, West SC. Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev.* 2001; 15: 3296-07.

Masutani M, Nakagama H, Sugimura T. Poly(ADP-ribosylation in relation to cancer and autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(24): 769-83.

Mateuca R, Aka PV, de Boeck M, Hauspie M, Kirsch-Volders M, Lison D. Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicol Letters.* 2005; 156(2): 277-88.

Matheus LC, Cabarcas SM, Hurts E. DNA Repair of cancer stem cells. *Springer.* 2013; 178: 19-31.

Melve KK, Skjaerven R. Outcomes of pregnancies following a birth with major birth defects: A population based study. *Early Hum Dev.* 2008; 84(10): 651-57.

Mellon I, Bohr VA, Smith CA, Hanawalt PC. Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1986; 83(23): 8878-82.

Mendes R, Waissmann W, editores. *Aspectos Históricos da Patologia do Trabalho/Patologia do Trabalho Atualizada e Ampliada.* São Paulo: Atheneu, 2003; 3-46.

Menegotto BC.; Salzano FM. Epidemiology of oral clefts in a large South American sample. *Cleft Palat Craniofac J.*1991; 28(4):373-76.

Menezes R, Marazita ML, Goldstein MHT, Cooper ME, Bardi K, Brandon C, Letra A, Martin RA, Vieira AR. 2009. AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. *J Am Dent Assoc.* 2009; 140(1): 80- 84.

Meyer KA, Werler MM, Hayes C, Mitchell AA. Low maternal alcohol consumption during pregnancy and oral clefts in off spring: the Slone Birth Defects Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2003; 67(7): 509-14.

Miao X, Zhang X, Zhang L, Guo Y, Hao B, et al. Adenosine diphosphate ribosyl transferase and x-ray repair cross-complementing 1 polymorphisms in gastric cardia cancer. *Gastroenterol.* 2006; 131: 420-427.

Minamoto T, Mai M, Ronal Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep. *Carcinogenesis.*1999; 20: 519–27.

Mirfazeli A, Nafisek K, Reza k, Golalipour M, Incidence of cleft lip and palate in Gorgan- Northern Iran: An Epidemiological Study. *Oman Med J.* 2012; 2(6): 461- 64.

Mitchell LE, Beaty TH, Lidral AC, Munger RG, Murray JC, Saal HM. Guidelines for the design and analysis of studies on nonsyndromic cleft lip and cleft palate in humans: summary report from a Workshop of the International Consortium for Oral Clefts Genetics. *Cleft Palate Craniofac J.* 2002; 39(1): 93-100.

Mitchell LE, Christensen K. Analysis of the recurrence patterns for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the families of 3,073 Danish probands. *Am J Med Genet.* 1996; 61(4):371-76.

Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, Igarashi S, Kotake K, Koyama Y, Nagai H. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterol.* 2001; (121): 1300-09.

Mocellin S. DNA repair gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2009; (30): 1735-43.

Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem*. 2006; 281(41): 30305-09.

Monlleo IL, Lopes GSVL. Craniofacial anomalies: description and evaluation of treatment under the Brazilian Unified Health System. *Cad Saude Publica*. 2006; 22(5): 913-22.

Mooney MP, Siegel MI. Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting. New York: John Wiley and Sons. 2002; 251-72.

Moreira HSBM. Equipamento de proteção individual e saúde no campo. *The Fiep Bulletin*. 2009; 79: 268-74.

Moreno LM, Mansilla MA, Bullard SA, Cooper ME, Busch TD, Machida J, Johnson MK, Brauer D, Krahn K, Daack-Hirsch S, L'heureux J, Valencia-Ramirez C, Rivera D, López AM, Moreno MA, Hing A, et al. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Hum Mol Genet*. 2009; 18 (24): 4879-96.

Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip palate. *Lancet*. 2009; 374(9703): 1773-85.

Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Biedziak B, Paradowska P, Jagodzinski PP. Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the Polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010; 88(7): 538-45.

Mukhopadhyay P, Greene RM, Zacharias W, Weinrich MC, Singh S, Young WW, Jr W et al. Developmental gene expression profiling of mammalian, fetal orofacial tissue. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2004; 70: 912-26.

Munger RG, Romiti, PA, Daack HS, Burns TL, Murray KC, Hanson. J Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology*. 1996; 54:27-33.

Murray J: Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*. 2002; 61: 248-56

Murray JC, Daack-Hirsch S, Buetow KH, Munger R, Espina L, Aglinawan N, Villanueva E, Rary J, Magee K, Magee W. Clinical and epidemiological studies of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J*. 1997; 34: 7-10.

Murray T, Taub MA, Ruczinski I, Scott AF, Hetmanski JB, Schwender H et al. Examining markers in 8q24 to explain differences in evidence for association with cleft lip with/without cleft palate between asians and europeans. *Genet Epidemiol.* 2012; 36(4): 392-99.

Nagem FH, Moraes N, Rocha RGF. Contribuição para o estudo da prevalência das más formações congênitas lábio-palatais na população escolar de Bauru. *Rev Fac Odontol São Paulo.* 1968; 6: 111-28.

Naqvi R. A. Hypermethylation analysis of mismatch repair in locally advanced breast cancer in Indian women. *Hum Pathol.* 2008; 39(5): 672-80.

Neves ACC. Anomalias dentárias em pacientes portadores de fissuras labiopalatinas :revisão de literatura. *Revista Biociência.* 2002; 8(2): 75-81.

Neville B, Damm D, Allen C, Bouquo J. *Patologia Oral Maxilofacial.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

Nho K, Corneveaux JJ, Kim S, Lin H, Risacher SL, Shen L, Swaminathan S, Ramanan VK, Whole-exome sequencing and imaging genetics identify functional variants for rate of change in hippocampal volume in mild cognitive impairment. *Mol Psychiatry.* 2013; 18(7): 781-7.

Nishimura S. Involvement of mammalian OGG1 in excision of the 8-hydroxyguanine residue in DNA. *Free Radical Biology & Medicine.* 2002; 32 (9): 813-21.

Noor SN, Musa S. Assessment of patients' level of satisfaction with cleft treatment using the Cleft Evaluation Profile. *Cleft Palate Craniofac J.* 2007; 44: 292-303.

Nopoulos P, Langbehn DR, Canady J, Magnotta V, Richman L. Abnormal brain structure in children with isolated clefts of the lip or palate. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007; 161(8): 753-8.

North JA, Ravindra Amunugama R, Klajner M, Bruns AN, Poirier MG, Fishel R. ATP-dependent nucleosome unwrapping catalyzed by human RAD51. *Nucleic Acids Research.* 2013; (15) 41: 7302-12.

Nunes LMN. Prevalência de fissuras labiopalatais e sua notificação no sistema de informação. [Mestrado] Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 2006.

Ojajarvi JA, Partanen TJ, Ahlbom A, Boffetta P, Hakulinen T, Jourenkova N, Kauppinen TP, Kogevin M, Porta M, Vainio HU. Occupational exposures and pancreatic cancer: A meta-analysis. *Environmental Occupational.* 2000; 57(5): 316-24.

Olshan FA, Shaw GM, Millikan RC, Laurent C, Finnell RH Polymorphisms in DNA Repair Genes *Ame J Med Genet.* 2005; 135(3): 268-73.

Oliveira LP. Avaliação de instabilidade de microssatélites e expressão imunoistoquímica das proteínas hMLH1 e hMSH2 em pacientes com suspeita de câncer colorretal hereditário sem polipose. [Mestrado] São Paulo; Fundação Antônio Prudente. 2008.

Osorio A, RL Milne, Alonso R, Pita G, Peterlongo P, Teule A, Nathanson KL, Domchek SM, Rebbeck et al. Evaluation of the XRCC1 gene as a phenotypic modifier in BRCA1/2 mutation carriers. results from the consortium of investigators of modifiers of BRCA1/BRCA2. *Br J Cancer.* 2011; 104(8): 1356-36.

Pacheco AG, Moraes, MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Disease markers.* 2009; 27(3):173-186.

Pan Y, ZhangW, Du Y, Tong N, Han Y, Zhang H, Wang M, Ma J, Wan L, Wang L. Different roles of two novel susceptibility loci for nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population. *Am J Med Genet.* 2011; 155(9): 2180-85.

Paraná. Secretaria de Estado de Saúde. Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Lábio Palatal.[internet]. Curitiba. 2001.[acesso 21 abril 2014] Disponível em: <<http://www.caif.saude.pr.gov.br>>.

Paranaiba LMR, Aquino SN, Bufalino A, Martelli H Jr ; Graner E, Coletta RD, Swerts MSO. 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): 414-20.

Paranaiba LMR, Bufalino A, Martelli H Jr ; Barros LM ; Graner E. Coletta RD . Lack of association between IRF6 polymorphisms non syndromic cleft lip and palate in a Brazilian population. *Oral Dis.* 2010; 16(2): 193-97.

Paranaiba, LMR ; Coletta RD, Barros LM, Swerts MSO, Martelli H Jr . Prevalence of Dental Anomalies in Patients with Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate in a Brazilian population. *Cleft Palate Craniof J.* 2013; 50(4): 400-05.

Park-Wyllie L, Mazzotta P et al. Birth defects after meternal exposure to corticosteroids: prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies. *Teratology.* 2000; 62(6): 385-92.

Paulozzi LJ, Lary JM. Laterality patterns in infants with external birth defects. *Teratology.* 1999; 60(5): 265-71.

Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(7): 735-40.

Pierce AJ, Johnson RD, Thompson IH, Jasin M. XRCC3 Promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes & Development.* 1999; 13: 2633-38.

Popoff, DAV, Coelho MP, Martelli DRB, Coletta RD, Martelli-Júnior H. Non-syndromic oral clefts and risk of cancer: a systematic review. *Dentistry.* 2013; 1: 5-10.

Plowchalk D, Meadows MJ, Mattison DR. Female Reproductive Toxicology In: Paul M, Occupational and Environmental Reproductive Hazards: A guide for clinicians. Maryland: Williams & Wilkins. 1993; 18-24.

Prescott NJ, Malcolm S. Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *Cleft Palate Craniofac J.* 2002; 39(3): 327-31.

Przybyłowska K, Kabzinski J, Sygut A, Dziki L, Dziki A, Majsterek I. An association selected polymorphisms of XRCC1, OGG1 and MUTYH gene and the level of efficiency oxidative DNA damage repair with a risk of colorectal cancer. *Mutat Res.* 2013; 6-15.

Qin Q, Lu J, Zhu H, Xu L, Cheng H, Zhan L, Yang X, Zhang C, Sun X. PLoS One. PARP-1 Val762 Ala. Polymorphism and Risk of Cancer: A Meta-Analysis Based on 39 Case-Control Studies. *Plos One.* 2014; 9(5): 22-29.

Qiu LX, Yao L, Zhang J, Zhu XD, Zhao XM, Xue K, et al. Xpd lys751gln polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta analysis involving 28,709 subjects. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 124: 229-35.

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

Ravichandran K, Shoukri M, Aljohar A, Shazia NS, Al-Twajjri Y, Al Jarba I. Consanguinity and occurrence of cleft lip/palate: A Hospital-Based Registry Study in Riyadh. *Am J Med Genet Part A.* 2012; 158: 541-46.

Reynolds P, Von Behren J, Gunier RB, Goldberg DE, Harnly M, Hertz A. Agricultural pesticide use and childhood cancer in California. *Epidemiology.* 2005; 16(1): 93-100.

Rezende KMPC. Zollner MSAC. Ocorrência de Fissuras labiopalatais no município de Taubaté nos anos de 2002 a 2006. *Pediatria.* 2008; 30 (4): 203-07.

Ribeiro EM, Moreira ASCG. Atualização e tratamento multidisciplinar da Fissura labial e palatal. *Rbps*.2005; (1): 31-40.

Rice DPC. Craniofacial Anomalies: From Development to Molecular Pathogenesis. *Current Molecular Medicine*. 2005; 5: 699-22.

Riley BM, Schultz RE, Cooper ME, Goldstein-McHenry T, Daack-Hirsch S, Lee KT et al. A genome-wide linkage scan for cleft lip and cleft palate identifies a novel locus on 8p11-23. *Am J Med Genet Part A*. 2007; 143: 846-52.

Rittler M, Liascovich R, López-Camelo J, Castilla EE. Parental consanguinity in specific types of congenital anomalies. *Am J Med Genet*. 2001; 1029(3): 36-43.

Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res*. 2009; 23(1): 38-42.

Rodrigues LB, Pimenta JR, Pena SDJ. The Genetic Structure of Human Populations Studied Through Short Insertion-Deletion Polymorphisms. *J. compilation*. 2006; 70:658-665.

Rojas-Martinez A, Reutter H, Chacon-Camacho O, Leon-Cachon RB, Munoz-Jimenez SG, Nowak S et al. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population: Evidence for IRF6 and variants at 8q24 and 10q25. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010; 88(7): 535-37.

Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack HS, Burns T L, Murray JC. 1999. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environmental interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology*.1999; 59: 39-50.

Romiti PA, Sun L, Honein MA, Reefhuis J,Correa A, Rasmussen AS, Maternal periconceptional alcohol consumption and risk orofacial clefts. *Am J Epidemiol*. 2007a; 166(7): 775-85.

Romitti PA, Herring, AM, Dennis LK, Wong-Gibbons DL. Meta-Analysis: Pesticides and OrofacialClefts.*CleftPalateCraniofac. J*.2007b; 44(4): 358-365.

Ronen A, Glickman BW. Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen*. 2001; 37(3): 241-83.

Roszak A, Lianeri M, Sowinska A, Jagodzinski PP. Involvement of PARP-1 Val762Ala polymorphism in the onset of cervical cancer in caucasian women. *Mol Diagn Ther*. 2013; 17: 239-45.

Rulten SL, Rotheray A, Green RL, Gabrielle J, Grundy DAQ, Moore FG, Herreros G, Hafezparast M, Caldecott M. PARP-1 dependent recruitment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated protein FUS/TLS to sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 2014; 42(1): 307-14.

Sanchez de Abajo A, de la Hoya M, van Puijenbroek M, Godino J, Díaz-Rubio E, Morreau H, et al. Dual role of LOH at MMR loci in hereditary non-polyposis colorectal cancer ? *Oncogene*. 2006; 25 (14): 2124-30.

Sandrini FAL. Estudo familiar de pacientes com anomalias associadas às Fissuras Labiopalatais no serviço de Defeitos da Face da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.[Mestrado].Porto Alegre: Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2005.

Santos, J. et al. Uso de trios caso-padres en estudios epidemiológicos de asociación entre polimorfismos genéticos y enfermedades complejas. *Rev Med Chil*. 2002; 130(11): 1307-15.

Santos RC, Barros LM, Orsi JJ, Bonan PRF, Martelli H Jr, Alterações sistêmicas em portadores de fissuras lábio-palatais, não sindrômicas. *Rev Bras Odontol*. 2006; 63: 182-85.

Sebro R, Rogus JJ. The power of the Transmission Disequilibrium Test in the presence of population stratification. *Eur J Hum Genet*. 2010; 18(9): 1032-8.

Sak SC, Barrett JH, Paul AB, Bishop DT, Kiltie A. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and bladder cancer risk. *BMC Genetics*. 2007; 8: 13-18.

Seong MW, Hwang JH, Moon JS, Ryu HJ, Kong SY, Um TH, et al: Neonatal hair nicotine levels and fetal exposure to paternal smoking at home. *Am J Epidemiol*. 2008; 168(10): 1140-44.

Shaw G, Gold EB. Methodological considerations in the study of parental occupational exposures and congenital malformations in off spring. *Scandinavian. J Work Environ Health*. 1988; 14:344-55.

Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, et al. 1995. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid preconceptionally. *Lancet* .1995; 346:393-96.

Shaw GM, Carmichael SL, Nelson V, Selvin S, Schaffer DM. Food fortification with folic acid and twinning among California infants. *Am J Med Genet* 2003; 119: 137-40.

Shaw R, Richardson D, McMahon S. Conservative management of otitis media in cleft palate Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. 2003; 31: 316-20.

Shaw GM, Carmichael SL, Laurent C, Rasmussen SA. Maternal nutrient intakes and risk of orofacial clefts. Epidemiology. 2006; 17(3): 285-91.

Sheffer RF, Hirata E, Estudo da prevalência de fissura labiopalatina nos estados brasileiros de acordo com o SISNAC (2000 – 2007) e sua relação com o IDH. [Especialização]. Cascavel, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2010.

Sheffer RF, Davidoff DCO, Prevalência de fissuras labiopalatais e sua notificação no sistema de informação da cidade de Cascavel – Pr. [Bacharelado]. Cascavel, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2007.

Shi Q, Ko E, Barclay L, Hoang T, Rademaker A, Martin R: Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. Mol Reprod Dev. 2001; 59: 417-21.

Shi M, Christensen K, Weinberg CR, Romitti P, Bathum L, Lozada A, Morris RW, Lovett M, Murray JC. Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification gene variants. Am J Hum Genet. 2007; 80(1): 76-90.

Shi M, Wehby GL, Murray JC. Review on genetic variants and maternal smoking in the etiology of oral clefts and other birth defects. Birth Defects Res C Embryo Today. 2008; 84(1): 16–29.

Shi CL, Li R, Xiong LW, Gu AQ, Han BH, Gu W. Lack of association between XRCC3 rs861539 (C > T) polymorphism and lung cancer risks: an update meta-analysis. Tumour Biol. 2013; 34(3): 1819-24.

Shiokawa M, Masutani M, Fujihara H, Ueki K, Nishikawa R, et al. Genetic alteration of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in human germ cell tumors. Jpn J Clin Oncol. 2005; 35: 97–102.

Shkoukani M, Chen M, Vong A Cleft lip- a comprehensive review. Frontiers Pediatrics. 2013; 1: (53)1-10.

Silva FC, Valentin MD, Ferreira F de O et al. Mismatch repair genes in Lynch Syndrome: a review. Sao Paulo Med J. 2009; 127(1): 46-51.

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: 432-34.

Smith TL, Di Ruggiero DC, Jones KR, Recovery of eustachian tube function and hearing outcome in patients with cleft palate, *Otolaryngol. Head Neck Surg.*1994; 111: 423-29.

Smith TR, Levine EA, Freimanis RI, Akman SA, Allen GO, et al. Polygenic model of DNA repair genetic polymorphisms in human breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 2008; 29: 2132-38.

Souza J, Raskin S. Caracterização clínica e epidemiológica das fissuras orais em uma amostra de pacientes nascidos no Paraná. [Mestrado]. Curitiba, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2011.

Souza JCM, Solarewicz MM, Mordaski RYM, Passoni CRMS, Ferrari LP, Mikami L. Síndrome Cromossômicas: Uma revisão. *Cadernos da Escola de Saúde.* 2010; 3:1-12.

Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo.*1972; 27(1): 5-6.

Spitz MR, Wu X, Wang Y, Wang LE, Shete S, Amos CI, Guo Z, Lei L, Mohrenweiser H, Wei Q: Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res.* 2001; 61: 1354-357.

Sproule J. Hereditary nature of hare lip. *Br Med J*1863; 1:412.

Steinwachs E, Amos C, Johnston D, Mulliken J, Hecht J. Non syndromic cleft lip and palate is not associated with cancer or other birth defects *Am J Hum Genet* 2000; 90: 17-24.

Stojic, L., Brun, R., Jiricny, J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair.* 2004; 3: 1091-01.

Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Epidemiological and genetic study in 207 cases of oral clefts in Alsance, north eastern France. *Am J Med Genet.*1991; 28 (5): 325-9.

Stoll C, Alembik Y, Dott B, et al. Associated malformations in cases with oral clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37(1): 41-7.

Su Y, Xu A, Zhu J The effect of oxoguanine glycosylase 1 rs1052133 polymorphism on colorectal cancer risk in Caucasian population. *Tumour Biol.* 2014; 35(1): 513-7.

Sudhakar J, Khetan V, Madhusudan S, Krishnakumar S. Dysregulation of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) expression in advanced retinoblastoma. *Br J Ophthalmol.* 2014; 98(3): 402-7.

Sugasawa K, Ng JM, Masutani C et al. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*.1998; 2(2): 223-32.

Sugasawa K, XPC: its product and biological roles. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 637:47-56

Sung P, Bailly V, Weber C, Thompson LH, Prakash L, et al. Human Xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature*.1993; 365(6449): 852-55.

Taioli E, Ragin C,Robertson L,Linkov F,Thurman NE,Vieira AR,Cleft Lip and palate in family members of cancer survivors. *Cancer Investig*. 2010; 20:1-5.

Thacker J.The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett*. 2005; 219: 125-35.

Tanaka Y, Zaman MS, Majid S, et al. Polymorphisms of MLH1 in benign prostatic hyperplasia and sporadic prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 383: 440-4.

Tapadia MD, Cordero DR, Helms JA. It's all in your head: new insights into craniofacial development and deformation. *J Anat*. 2005; 207: 461-77.

Tlmofeyeva NA. Lys98 Substitution in Human AP Endonuclease 1 Affects the Kinetic Mechanism of Enzyme Action in Base Excision and Nucleotide Incision Repair Pathways. *PLoS One*.2011; 6 (9): 24063.

Tse D, Zhai R, Zhou W, Heist RS, Asomaning K et al. Polymorphisms of the NER pathway genes, ERCC1 and XPD are associated with esophageal adenocarcinoma risk. *Cancer Causes and Control*. 2008; 19: 1077-83.

Tudek B. Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Mol Asp Med*. 2007; 28: 258-75.

Tell G et al. The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7(3-4): 367-84.

Thacker J.The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Letters*. 2005; 219: 125-35.

Thibodeau N, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon *Science*. 1993; 260: 816-19.

Thompson & Thompson. editores. *Genética Médica* Guanabara Koogan Rio de Janeiro. 2002; 76-82.

Tolarova M. Periconceptional supplementation with vitamins and folic acid to prevent recurrence of cleft lip. *Lancet*. 1982; 24; 2(8291): 217.

Tolarova M. A study of the incidence, sex-ratio, laterality and clinical severity in 3660 probands with facial clefts in Czechoslovakia. *Acta Chir Plast* 1987; 29: 77-87.

Tolarova MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet*. 1998.13;75(2):126-37.

Trew CJ. Sistens plura exempla palati deficientis. *Acta Aced. Leop. Carol*. 1757; 1: 445-47.

Trindade IEK, Silva FOG, editores. *Fissuras labiopalatinas, uma abordagem interdisciplinar*. Santos São Paulo, 2007.

Van Gent DC, Hoeijmakers JHJ, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews. Genetics*. 2001; 2(3): 196-206.

Van Rooij A, Wegerif MJ, Roelofs HM, Peters WH, Kuijpers-Jagtman AM, Zielhuis GA, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environment interaction. *Epidemiology*. 2001; 12(5): 502-507.

Van Rooij IALM, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LAJ, et al. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate? *Am J Epidemiol* 2003; 157: 583-91.

Van Roon EHJ, van Puijenbroek M, Middeldorp A et al. Early onset MSI-H colon cancer with MLH1 promoter methylation, is there a genetic predisposition? *BMC Cancer*. 2010; 10: 180-86.

Vermeulen, W. et al. A temperature-sensitive disorder in basal transcription and DNA repair in humans. *Nature Genet*. 2001; 27, 299-03.

Vico RM, Linares AI, Mendo IG, Lagares DT, Moles MAG, Pérez JLG, Reina ES. A descriptive epidemiologic study of cleft lip and palate in Spain. *Oral and maxillofacial Surgery*. 2012; 114 (5): 1-5.

Vieira AR, Orioli I. Birth order and oral clefts: a meta analysis. *Teratology*. 2002a; 66(4): 209-16.

Vieira AR, Orioli IM, Murray JC. Maternal age and oral clefts: A reappraisal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002b; 94(5): 530-5.

Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only. *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41: 689-93.

Vieira AR, Khaliq S, Lacey B. Risk of cancer in relatives of children born with isolated cleft lip and palate. *Am J Med Genet* 2012; 158: 1503-4.

Vinson RK, Hales BF. DNA repair during organogenesis. *Mutat Res*. 2002; 509(1-2): 79-91.

Vlastos IM, Koudounakis E, M. Houlakis, Nasikaa M, Griva M, Stylogianni E . Cleft lip and palate treatment of 530 children over a decade in a single centre *Int J Pediat Otorhinolaryngol*. 2009; 73: 993-97.

Vral A, Willems P, Claes KB, Poppe A, Baeyens G, Perletti Thierens H. Combined effect of polymorphisms in Rad51 and XRCC3 on breast cancer risk and chromosomal radiosensitivity. *Mol med reports*. 2011; 4: 901-12.

Wang J, Luo M, Zhang Z. Clinical and molecular analysis of hereditary non-polyposis colorectal cancer in Chinese colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 1612-7.

Wang R, Zhang Y, Zhang J, Zhi X. Association of X-ray repair cross-complementing group 1 promoter rs3213245 polymorphism with lung cancer risk. *Tumour Biol*. 2014; 35(3): 1739-43.

Wehby G, Jeffrey C. Murray. Folic Acid and Orofacial Clefts: A Review of the Evidence *Oral Dis*. 2010a; 16(1): 11-19.

Wehby GL, Cassell CH. The impact of orofacial clefts on quality of life and health care use and costs. *Oral Dis*. 2010b; 16:3-10.

Wehby GL, Murray JC. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Dis*. 2010; 16: 11-19.

Weiberg SM, Parsons TE, Fogel Mr, Walter CP, Conrad AL, Nopoulos P. Corpus Callosum shape is altered in individuals with nonsyndromic cleft and palate *Am J Med Genet*. 2013; 161: 1002-7.

WHO Human Genetics Programme. Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies:report of WHO meetings on international collaborative research on craniofacial anomalies, Geneva, Switzerland,5-8 November 2000; Park City, Utah, U.S.A., 24-26 May 2001; Geneva, World Health Organization; 2002. York, NY. 2002; 240-54.

Werbrouck, J. et al. Single-nucleotide polymorphisms in DNA double-strand break repair genes: association with head and neck cancer and interaction with tobacco use and alcohol consumption. *Mutat.* 2008; 656: 74-81.

Winsey SI,Haldar NA,Marsh HP,Bunce M, Marshall SE, Harris AI, Wojnarowska F, Welsh KL. A variant with in the DNA. repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res.* 2000; 60: 5612-16.

Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ.* 2007; 334: 64.

Wilkie AO, Morriss-Kay G.M. Genetics of craniofacial development and malformation. *Genetics.* 2001; 2: 458-68.

Wilson JG, Fraser F. Current Status of Teratology. The hand book of Teratology. New York: Plenum Press; 1977:47-4.

Wu T, Liang KY, Hetmanski JB, Ruczinski I, Fallin MD, Ingersoll RG, Wang H, Huang S, Ye X,Wu-Chou YH, Chen PK, Jabs EW, Shi B, Redett R, Scott AF, Beaty TH. Evidence of gene environment interaction for the IRF6 gene and maternal multivitamin supplementation in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate. *Hum Genet.* 2010; 128(4): 401-10.

Wu-Chou et al.: A combined targeted mutation analysis of IRF6 gene would be useful in the first screening of oral facial clefts. *BMC Med Genet* 2013; 14: 37.

Wu T, Schwender H, Ruczinski I, Murray JC, Marazita ML, et al. Evidence of Gene2Environment Interaction for Two Genes on Chromosome 4 and Environmental Tobacco Smoke in Controlling the Risk of Nonsyndromic Cleft Palate. *Plos One.* 2014; 9(2): 880-88.

Wyszynski DF, Beaty, TH. Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratol.* 1996; 53: 309-17.

Wyszynski DF, Wu T. Use of US birth certificate data to estimate the risk of maternal cigarette smoking for oral clefting. *Cleft Palate Craniofac J* 2002; 39: 188-92.

Wyszynski DF. Preface. In: Wyszynski DF, editor. Cleft lip and palate: From origin to treatment. Boston: Oxford University Press; 2002.

Wyszynski DF, Albacha-Hejazi H, Aldirani M, et al. A genome-wide scan for loci predisposing to non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in two large Syrian families. *Am J Med Genet.* 2003; 123A:140-47.

Xue H, Lu Y, Lin B, Chen J, Tang F, et al. The Effect of XPD/ERCC2 Polymorphisms on Gastric Cancer Risk among Different Ethnicities: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One.* 2012; 7(9): 434-37.

Yamada NA, Hinz JM, Kopf VI, Segalle KD, Thompson IH. ATPase activity is required for normal XRCC3-Rad51C complex dynamics and homologous recombination. *J Biol Chem.* 2004; 279(23): 250-54.

Yang J, Carmichael SL, Canfield M, Song J, Shaw GM. Socioeconomic status in relation to selected birth defects in a large multicentered US case-control study. *Am J Epidemiol* 2008; 167(10): 145-54.

Yan Y, Liang H, Light M, Li T. XPD Asp312Asn and Lys751Gln polymorphisms and breast cancer susceptibility: A meta-analysis. *Tumor Biol.* 2014a; 35(1): 1907-15

Yan Y, Liang H, Li T, Guo S, Li M, Qin X, Li S. Association of XRCC3 Thr 241 Met polymorphism and leukemia risk: evidence from a meta-analysis. *Leuk Lymphoma.* 2014b; 150-57.

Yang W, Carmichael SL, Roberts EM, Kegley SE, Padula AM, English PB, Shaw GM. Residential agricultural pesticide exposures and risk of neural tube defects and orofacial clefts among offspring in the San Joaquin Valley of California. *Am J Epidemiol.* 2014c; 179(6): 740-8.

Yi Z, Lan Z, Zhen S, Dong L S, Han R, Liu Song B, Dong R. Genetic polymorphisms in DNA Repair Genes OGG1, APE1, XRCC1, and XPD and the Risk of Age-Related Cataract. *Ophthalmol.* 2012; 119(5): 900-906.

Yin QH, Liu C, Hu JB, Meng RR, Li L, Wang YJ. Xpd lys751gln and asp312asn polymorphisms and gastric cancer susceptibility: a meta analysis of case-control studies. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 4(1): 231-6.

Yoo S, McKee BD. Overexpression of Drosophila Rad51 protein (DmRad51) disrupts cell cycle progression and leads to apoptosis. *Chromosoma.* 2004; 113 (17): 92-101.

Yoon H, Chung IS, Seol EY, Park BY, Park HW. Development of the lip and palate in staged human embryos and early fetuses. *Yonsei Med J*; 41:477–484. J.2004; 10(10): 331-336.

Yu Z, Chen J, Ford BN, Brackley ME, Glickman BW. Human DNA repair systems: An overview. *Environ Mol Mutagen*. 1999; 33 (1): 3-20.

Yu CC, Wong FH, Lo LJ, et al. Hereditary cleft lip/palate and Wilms tumor: a rare association. *Cleft Palate Craniofac J*. 2002; 39(7): 376-79.

Yu X, Liu J, Zhu H, Xia Y, Gao L, Dong Y, Jia N, Shen W, Yang Y, Niu W. Synergistic association of DNA repair relevant gene polymorphisms with the risk of coronary artery disease in northeastern Han Chinese. *Thromb Res*. 2014; 133(2): 229-34.

Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LMP, editores. *Biologia Molecular Básica*. 3.ed., Porto Alegre: Mercado Aberto. 2003; 22-23

Zhang J, Zhou J, Zhang P, Wang W, Tao S, Wang M. A meta-analysis of the association between the hOGG1 Ser326Cys polymorphism and the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013; 8 (6): 5742.

Zaremba T, Ketzer P, Cole M, Coulthard S, Plummer ER, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 polymorphisms, expression and activity in selected human tumour cell lines. *Br J Cancer*. 2009; 101(2): 256-262.

Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagen*. 2001; 16(4): 359–63.

Zhang et al.: Association between polymorphisms in ERCC2 gene and oral cancer risk: evidence from a meta-analysis. *BMC Cancer* 2013; 13: 594.

Zhang Q, Jin H, Wang L, Xin B, Zhang J, Zhou Y, Sheng S Lung cancer risk and genetic variants in East Asians: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014; MID. 24 (51): 56-59.

Zhou B, Shan H, Su Y, Xia K, Shao X, Mao W, Shao Q. The association of APE1 - 656T > G and 1349 T > G polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 37 case-control studies. 2011; 521(11): 150-58.

Zhu H, Kartiko S, Finnell R H. Importance of gene-environment interactions in the etiology of selected birth defects. *Clin.Genet*. 2009; 75(5): 409-23.

Zhu JL, Basso O, Hasle H, Winther JF, Olsen JH, Olsen J. Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? A nationwide study in Denmark. *Br J Cancer* 2002; 87(5): 524-28.

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

ANEXO 1

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

	<p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</p>	
<h3>CERTIFICADO</h3>		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise de fatores genéticos e ambientais em pacientes com fissura labial e/ou palatina não síndrômica - FIP/NS na região oeste do Paraná", protocolo nº 071/2012, dos pesquisadores Ricardo Della Coletta, Dalane Daniele Pootz, Denise Cesar de Oliveira Davidoff, Helenara Salvati Bertolossi Moreira e Pedro Henrique Kusdra, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 13/09/2012.</p>		
<p>The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project "Analysis of genetic and environmental factors in patients with nonsyndromic cleft lip and / or palatine - NS/CLP in western Parana", register number 071/2012, of Ricardo Della Coletta, Dalane Daniele Pootz, Denise Cesar de Oliveira Davidoff, Helenara Salvati Bertolossi Moreira and Pedro Henrique Kusdra, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Sep. 13, 2012.</p>		
 Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta Secretária CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Dr. Jacks Jorge Junior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	
<p><small>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</small></p>		

ANEXO 2

Questionário

FICHA CADASTRAL PARA PACIENTES DO CENTRINHO- APOFILAB CASCAVEL

Número amostra:

1. Nome:	Data da avaliação : / /2012	
1.1 Coleta de material Trio sim () Não ()	Fissurado sim () Não () Mãe sim () Não () Pai sim () Não () AGENDAR PARA DIA _____ Data da coleta	
2. Gênero:	1. Masculino <input type="checkbox"/> ; 2. Feminino <input type="checkbox"/> .	Prontuário :
3. Data Nascimento:	____/____/____	() anos.
4. Nacionalidade	4.1 Naturalidade: _____ Cidade _____	
5. Zona:	1. Urbana <input type="checkbox"/> ; 2. Rural <input type="checkbox"/> . Endereço : _____	
5.1 contato telefônico Recado :	Fixo () Celular mãe Celular pai	
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 do paciente:	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. Dia da semana que frequenta o centrinho :		
9. Nome e data de nascimento materna:	_____/_____/____ () anos	
9.1. Nome e 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. Branco <input type="checkbox"/> ; 2. Moreno <input type="checkbox"/> ; 3. Amarelo <input type="checkbox"/> ; 4. Negro <input type="checkbox"/> .	
9.6. Consanguinidade:	1. Positiva <input type="checkbox"/> , 2. Negativa <input type="checkbox"/> Qual grau de parentesco _____	

<p>DURANTE A GRAVIDEZ :</p> <p>10. Profissão materna:</p> <p>10.1. Contato com produto químico?</p> <p>11. Profissão paterna:</p> <p>11.1. Contato com produto químico?</p> <p>11.2 Trabalho atual</p>	<p>1. Lavradora <input type="checkbox"/>; 2. Do lar <input type="checkbox"/>; 3. Estudante <input type="checkbox"/>; 4. Autônoma <input type="checkbox"/>;</p> <p>5. Não se aplica <input type="checkbox"/>; 6. Outros <input type="checkbox"/>. Qual? _____.</p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/>; 2. Não <input type="checkbox"/>; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/>. Qual? _____.</p> <p>1. Lavrador <input type="checkbox"/>; 2.Sem ocupação <input type="checkbox"/>; 3. Estudante <input type="checkbox"/>; 4. Autônomo <input type="checkbox"/>;</p> <p>5. Não se aplica <input type="checkbox"/>; 6. Outros <input type="checkbox"/>. Qual? _____.</p> <p>1. Sim <input type="checkbox"/>; 2. Não <input type="checkbox"/>; Não se aplica <input type="checkbox"/>. Qual? _____.</p> <p>1. Lavrador <input type="checkbox"/>; 2.Sem ocupação <input type="checkbox"/>; 3. Estudante <input type="checkbox"/>; 4. Autônomo <input type="checkbox"/>;</p> <p>5. Não se aplica <input type="checkbox"/>; 6. Outros <input type="checkbox"/>. Qual? _____.</p>
<p>12. Número de irmãos: () 1.Masculino (); 2.Feminino ().</p> <p>12. Ordem de Paridade (incluindo aborto): (* aborto; ** natimorto)</p> <p>12.1. 1^o Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/>; 2. Feminino <input type="checkbox"/>; ____/____/____; () anos.</p> <p>12.2. 2^o Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/>; 2. Feminino <input type="checkbox"/>; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/>. ____/____/____; () anos.</p> <p>12.3. 3^o Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/>; 2. Feminino <input type="checkbox"/>; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/>. ____/____/____; () anos.</p> <p>12.4. 4^o Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/>; 2. Feminino <input type="checkbox"/>; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/>. ____/____/____; () anos.</p> <p>12.5. 5^o Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/>; 2. Feminino <input type="checkbox"/>; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/>. ____/____/____; () anos.</p> <p>12.6. 6^o Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/>; 2. Feminino <input type="checkbox"/>; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/>. ____/____/____; () anos.</p> <p>12.7. 7^o Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/>; 2. Feminino <input type="checkbox"/>; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/>. ____/____/____; () anos.</p> <p>12.8. 8^o Filho: 1. Masculino <input type="checkbox"/>; 2. Feminino <input type="checkbox"/>; 3. Não se aplica <input type="checkbox"/>. ____/____/____; () anos.</p> <p>12.9. N° de filhos: ().</p> <p>12.10. Aborto(s): ().</p> <p>12.11. Natimorto(s): ().</p>	
<p>13. Renda familiar:</p> <p>1. até um salário mínimo (incluso) <input type="checkbox"/>;</p> <p>2. entre um e três salários mínimos (incluso) <input type="checkbox"/>;</p> <p>3. três a cinco salários mínimos (incluso) <input type="checkbox"/>;</p> <p>4. mais de cinco salários mínimos <input type="checkbox"/></p>	

<p>14. Hábitos maternos na gestação:</p>	<p>14.1. Álcool: 1. Sim <input type="checkbox"/>; 2. Não <input type="checkbox"/>.</p> <p>Quantidade: _____; Tempo de utilização: _____.</p> <p>14.2. Fumo: 1. Sim <input type="checkbox"/>; 2. Não <input type="checkbox"/>.</p> <p>Quantidade: _____; Tempo de utilização: _____.</p> <p>14.3. Drogas: 1. Sim <input type="checkbox"/>; 2. Não <input type="checkbox"/>.</p> <p>Qual(is)? _____.</p> <p>Quantidade: _____; Tempo de utilização: _____.</p>
<p>15. Suplementação na gestação: 1. Sem suplementação <input type="checkbox"/>; 2. Ácido fólico <input type="checkbox"/>; 3. Outras vitaminas <input type="checkbox"/>;</p> <p>4. Não sabe informar <input type="checkbox"/>.</p> <p>15.1. Se respondeu outras vitaminas, quais (qual)? _____.</p> <p>15.2. Trimestre da gravidez em que usou suplementação: 1. 1º Trimestre <input type="checkbox"/>; 2. 2º Trimestre <input type="checkbox"/>;</p> <p>3. 3º Trimestre <input type="checkbox"/>; 4. Não se aplica <input type="checkbox"/>.</p> <p>15.3 Gestação a termo <input type="checkbox"/> ou não <input type="checkbox"/></p>	
<p>16. Uso de medicamentos na gestação: 1. Sim <input type="checkbox"/>; 2. Não <input type="checkbox"/>.</p> <p>16.1. Tipo de medicamento: _____.</p> <p>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"/>.</p> <p>16.3. Dosagem utilizada: _____.</p> <p>16.4. Tempo de utilização: _____.</p> <p>17. Uso de anticoncepcional antes da gestação? 1. Sim <input type="checkbox"/>; 2. Não <input type="checkbox"/>.</p> <p>17.1. Via de uso: 1. Oral <input type="checkbox"/>; 2. Injetável <input type="checkbox"/>. 17.2. Tempo de utilização: _____.</p>	

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. Estresse 1. Sim <input type="checkbox"/> ; 2. Não <input type="checkbox"/> . 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 engordou (máximo)? _____	Peso atual _____
19.5. Peso da criança ao nascimento: _____	19.4. Altura materna: _____
() Não sabe informar	19.6. Comprimento ao nascimento: _____ () Não sabe informar
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. 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"/> .	

22. Histórico familiar de fissurados: 1. Positivo ; 2. Negativo .

22.1. Grau de parentesco: _____.

22.2. Tipo de fissura:

1. FP (isolada) completa ; 2. FP (isolada) incompleta ;

3. FL (isolada) completa unilateral ; 4. FL (isolada) completa bilateral ; 5. FL (isolada) incompleta unilateral ;

6. F bilateral incompleta; 7. F bilateral completa ;

8. FLP completa unilateral esquerda ; 9. FLP completa unilateral direita ; 10. FLP bilateral incompleta ;

11. FLP bilateral completa ; 12. Fissuras raras (outras) : _____ 13. Não se aplica .

23. Primeiro atendimento:

1. Centrinho ; 2. Outra localidade . Onde? _____.

Quando foi feito o diagnóstico da fissura ? () pré parto () pós parto Quando ?

Quem fez o diagnóstico ? _____

24. Já foi submetido a procedimento cirúrgico? 1. Sim ; 2. Não .

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 ; 2. Não .

25.1. Tipo de cirurgia:

1.1 Queiloplastia Millard 1 ; 1.2. Queiloplastia Spina ; 1.3. Queiloplastia ;

2.1. Palatoplastia VonLangenback ; 2.2. Palatoplastia Veau ; 2.3. Palatoplastia Furlow ; 2.4. Palatoplastia ;

3.1. Rinoplastia Mccoomb ; 3.2 Rinoplastia Diógenes ; 3.3 Rinoplastia .

26. Tratamento ortognático: 1.Sim ; 2. Não

