

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *TGFA/TAQ I* E
FATORES AMBIENTAIS NAS FISSURAS ORAIS NÃO SINDRÔMICAS**

LILIANE TODESCHINI DE SOUZA

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Dissertação de Mestrado

2010

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *TGFA/TAQ I* E
FATORES AMBIENTAIS NAS FISSURAS ORAIS NÃO SINDRÔMICAS**

LILIANE TODESCHINI DE SOUZA

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

A apresentação desta dissertação é requisito do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Mestre.

Dissertação de Mestrado

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Souza, Liliane Todeschini

Estudo da Associação do polimorfismo TGFA/ TaqI e Fatores ambientais nas Fissuras Orais não sindrômicas/ Liliane Todeschini de Souza; orient. Roberto Giugliani – Porto Alegre, 2010.

f.: il.

Dissertação (Mestrado), apresentada à faculdade de Medicina de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Orientador: Giugliani, Roberto.

"Devemos, no entanto, reconhecer, como me parece, que o homem com todas as suas nobres qualidades... ainda sofre em sua prisão corpórea a indelével marca de sua humilde origem"

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu pais, pelo amor e carinho de sempre e por mostraram-me os verdadeiros valores da vida.

A minha irmã Lidiane por seu carinho, apoio e momentos de descontração.

Ao meu namorado Marcio pelo seu amor, paciência, carinho e parceria em tantos momentos.

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani, orientador e estimulador do meu crescimento profissional e pessoal.

À querida Dra. Têmis Maria Félix por toda a orientação, dedicação, incentivo, carinho e apoio fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas por fazerem parte desta jornada tão importante em minha vida.

À equipe da Secretaria do Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas pelas atividades de apoio e orientação à realização das disciplinas.

Aos amigos queridos do Laboratório de Medicina Genômica, pelo fundamental apoio e parceria em todos os momentos, em especial à Thayne pela ajuda e parceria neste trabalho.

Aos incansáveis parceiros de trabalho da equipe do PPFO, em especial a amiga e companheira Ana Paula Vanz por todo o maravilhoso empenho e dedicação que tivestes em nosso trabalho.

A maravilhosa equipe de trabalho do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

E, finalmente aos meus amigos do coração Ingrid Ewald, Liliana Cossio e Carlos Eduardo Pitroski, por toda parceria, compreensão e apoio nas horas mais difíceis tanto na execução deste trabalho quanto na minha vida pessoal.

As demais pessoas que contribuíram e incentivaram de alguma forma a realização deste trabalho; a todos o meu mais sincero obrigada.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	8
Resumo	10
1. Introdução	12
2. Revisão da literatura	14
2.1. Embriologia.....	14
2.1.1.Desenvolvimento do palato primário	14
2.1.2. Desenvolvimento do Palato Secundário.....	15
2.2. Epidemiologia	16
2.3. Etiologia	18
2.4. Genes Candidatos para fissura de lábio e ou palato	19
2.5. Fatores ambientais	21
2.6. TGFA	23
3. Objetivos	26
3.1. Geral	26
3.2. Específicos	26
4. Artigo	27
5. Considerações Finais:	39
6. Referências Bibliográficas	41
7. Anexos	46
7.1. Método para identificação do Polimorfismo TGFA/ Taq I.....	46
7.2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	47
7.3. Registro de Anomalias Craniofaciais	49
7.4. Normas da Revista : The Cleft Palate-Craniofacial Journal	52

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ABCA4</i>	ATP-binding cassette, sub-family A, member 4,
<i>BARX1</i>	BarH-like homeobox 1
<i>BCL3- B</i>	Cell lymphoma 3-encoded protein
<i>CYP1A1</i>	Citocromo p450, Família 1, sub-família A, polipeptideo 1
<i>DLX</i>	Fator de transcrição da homeodomain (Drosophilas)
FO	Fissuras Orais
FL	Fissura de lábio
FP	Fissura de palato
FLP	Fissura de lábio e palato
FL/P	Fissura de lábio associada ou não a fissura de palato
<i>FOXE1</i>	Fator de transcrição da tireóide 1
<i>GLI2</i>	Membro da familia GLI-Kruppel
<i>GST</i>	S-transferase
<i>IRF6</i>	Fator de regulação de interferon 6
<i>JAG2</i>	Gene jagged-2
<i>MAFB</i>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
<i>MSX1</i>	Msh homeobox 1
<i>MSX2</i>	Msh homeobox 2
<i>MTHFR</i>	5, 10 metileno-tetrahidrofolato redutase
<i>NAT1</i>	N-acetil transferase 1
<i>NAT2</i>	N-acetil transferase 2
<i>RARA</i>	Receptor de ácido retinóico alfa
<i>SHH</i>	Sonic hedgehog homolog

<i>SATB2</i>	homeobox SATB2
<i>SKI</i>	v-SKI sarcoma viral oncogene homolog
<i>SPRY2</i>	Sprouty homolog 2
<i>TBX10</i>	Gene do grupo T-box
<i>TGFA</i>	Fator de crescimento transformador alfa
<i>TGFB2</i>	Fator de crescimento transformador beta 2
<i>TGFB3</i>	Fator de crescimento transformador beta 3
TDT	Teste de desequilíbrio de transmissão
<i>TP63</i>	Gene que codifica a proteína tumoral P63

RESUMO

A Fissura oral (FO) é uma malformação craniofacial comum na espécie humana. Tem uma prevalência mundial de 1 a cada 600 nascidos vivos, sendo que esses dados variam segundo a região geográfica. Ocorrem devido à formação incompleta do lábio e/ou palato no processo da embriogênese facial. Crianças afetadas precisam de cuidados multidisciplinares. Clinicamente, os pacientes têm dificuldades na alimentação, fala, audição, deglutição, respiração e problemas odontológicos, além de sequelas sociais e psicológicas durante a vida adulta. A etiologia dessa malformação facial não está ainda totalmente esclarecida, em parte pela complexidade e diversidade dos mecanismos moleculares envolvidos durante o processo de embriogênese, além da influência dos fatores ambientais.

Desde a década de 80 estudos moleculares têm sido realizados para testar o envolvimento de genes no crescimento dos processos faciais. Acredita-se que há interação, pelo menos parcial, dos seguintes genes: *TGFA*, *TGFB 2 e 3*, *MSX1 e 2*, *BCL3*, *RARA*, *MTHFR*, *IFR6*, *BARX1*, *DLX*, *SHH* e *TP63*.

TGFA foi um dos primeiros genes estudados, sendo que os resultados demonstraram associação entre dois RFLP do gene *TGFA* (alelo C2 no sítio de restrição da Taq I e o alelo A2 no sítio da BamHI). Sua relevância biológica como candidato para FO é amparada por seu padrão de expressão em tecidos palatinos, especialmente na junção mediana e mesênquima subjacente palatino, principalmente no momento da fusão dos tecidos, pois promove a síntese de matriz extracelular e migração de células mesenquimais. O gene *TGFA* parece ter um papel importante em alguns grupos, principalmente quando associado a fatores ambientais, principalmente uso de álcool e fumo durante idade gestacional.

Este estudo teve como objetivo avaliar o papel do polimorfismo *TGFA/Taq I* e fatores ambientais em fissuras orais não sindrômicas. Foram incluídos neste estudo 175 núcleos familiares sendo que 96 trios completos. Dos propósitos 52% eram homens. As Fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) foram mais frequentes em homens (56,5%) enquanto que fissura de palato isolado (FPI) foi mais frequente em mulheres. Conforme dados observados na literatura. Foi também observada maior proporção de FL/P (147 casos) comparado com FPI (28 casos). Neste estudo nós não encontramos associação do polimorfismo *TGFA/TaqI* com fissuras orais, pois o TDT não foi estatisticamente significativo ($p=0,335$). Quando comparado os fatores ambientais (exposição ao álcool e ao fumo durante o período gestacional) com o genótipo e o fenótipo do propósito, nós também não encontramos diferença significativa entre os grupos de propósitos expostos e não expostos.

A identificação de outros fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento craniofacial poderá ajudar a entender os fatores genéticos envolvidos em fissuras orais. Nós também não encontramos evidência da exposição ao álcool e ao fumo em fissuras, entretanto a baixa prevalência desses fatores na nossa população poderia ter contribuído para este achado.

1. INTRODUÇÃO

A Fissura oral (FO) é uma malformação craniofacial comum na espécie humana. Tem uma prevalência mundial de 1 a cada 600 nascidos vivos, sendo que esses dados variam segundo a região geográfica (Jugessur et al., 2009). Em geral, é uma malformação isolada, isto é, não sindrômica e incluem fissura labial (FL), fissura palatina (FP) ou fissura labial associada ou não a fissura palatina (FL/P) (Mossey et al., 2009).

Ocorrem devido à formação incompleta do lábio e/ou palato no processo da embriogênese facial. Compreendem uma variedade de desordens que afetam os lábios, as cavidades orais e nasais. Clinicamente, os pacientes têm dificuldades na alimentação, fala, audição, deglutição, respiração e problemas odontológicos, além de sequelas sociais e psicológicas durante a vida adulta (Jugessur et al., 2009; Mossey et al., 2009).

Essa malformação representa um problema de saúde pública de médio e longo prazo (Jugessur et al., 2009). São anomalias que causam transtornos psicológicos e funcionais importantes aos seus portadores. Observações clínicas e resultados de pesquisas sugerem que crianças afetadas e seus familiares experimentam estresse crônico de ordem física, emocional e social (Sandrini et al., 2005), além de chamar a atenção para o ônus econômico que essa malformação acarreta, já que demanda tratamento cirúrgico reconstrutivo e corretivo, odontológico, fonoaudiológico, médico e psicológico (Murray et al., 2002; Bertoja et al., 2008; Lie et al., 2008).

Crianças afetadas precisam de cuidados multidisciplinares do nascimento até a vida adulta, além de ter maior taxa de morbidade e mortalidade comparada com

indivíduos não afetados (Mossey et al., 2009), sendo que existem relatos que as fissuras orais podem estar relacionadas com aumento no risco de câncer (Zhu et al., 2002).

A etiologia dessa malformação facial não está ainda totalmente esclarecida, principalmente as de origem não sindrômicas, em parte pela complexidade e diversidade dos mecanismos moleculares envolvidos durante o processo de embriogênese, além da influência dos fatores ambientais. Os fatores genéticos são considerados de grande importância, devido ao risco de recorrência destas malformações em descendentes dos afetados (Sandrini et al., 2005; Martelli-junior et al., 2006),

As Fissuras orais, também, estão relacionadas aos fatores ambientais, origem geográfica e estatus socioeconômicos. Entre os fatores ambientais, o uso do cigarro durante a gestação é o mais estudado, seguido pelo uso do álcool (Shi et al., 2007). O conhecimento de fatores genéticos e ambientais pode contribuir para o entendimento desta malformação assim como ajudar no aconselhamento genético destas famílias. A necessidade de várias intervenções na área da saúde associadas à alta prevalência justifica a importância do estudo das causas das fendas orofaciais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Embriologia

Alterações no processo do desenvolvimento normal da face podem levar a malformações da face, acarretando profundas consequências tanto clínicas (sobre a fisionomia, respiração, sucção, deglutição, mastigação e fala) quanto sociais (Wyszynski, 2002). Para melhor entendimento da gênese destas malformações é importante lembrar do padrão normal de desenvolvimento da face na espécie humana.

2.1.1.Desenvolvimento do palato primário

A formação do palato primário determina o desenvolvimento do lábio superior e a porção anterior do palato. O desenvolvimento facial normal é, inicialmente, demarcado pelo aparecimento da placa précordal na extremidade cefálica do disco embrionário formando o estomodeo em torno do 14^º dia pós-concepção. A face primordial é formada a partir da migração das células ectodérmicas da crista neural combinadas com as células mesodérmicas (Wyszynski,2002).

Em torno do 28^º dia pós-concepção formam-se espessamentos na eminência frontal decorrente da migração e da proliferação mitótica do ectomesênquima. Os primeiros espessamentos são os placódios olfatórios que migram anteriormente delimitando o orifício nasal estabelecendo os processos nasal lateral e nasal medial bilateralmente. Entre os dois processos nasais mediais encontra-se uma depressão denominada processo frontonasal. Os processos nasais mediais e frontonasais esquerdo e direito juntamente com os processos maxilares formarão a porção média

do nariz, do lábio superior, porção anterior do maxilar e o palato primário. O lábio inferior é formado pelos dois processos mandibulares (figura 1) (Ten Cate, 2001; Katchurian, 2004).

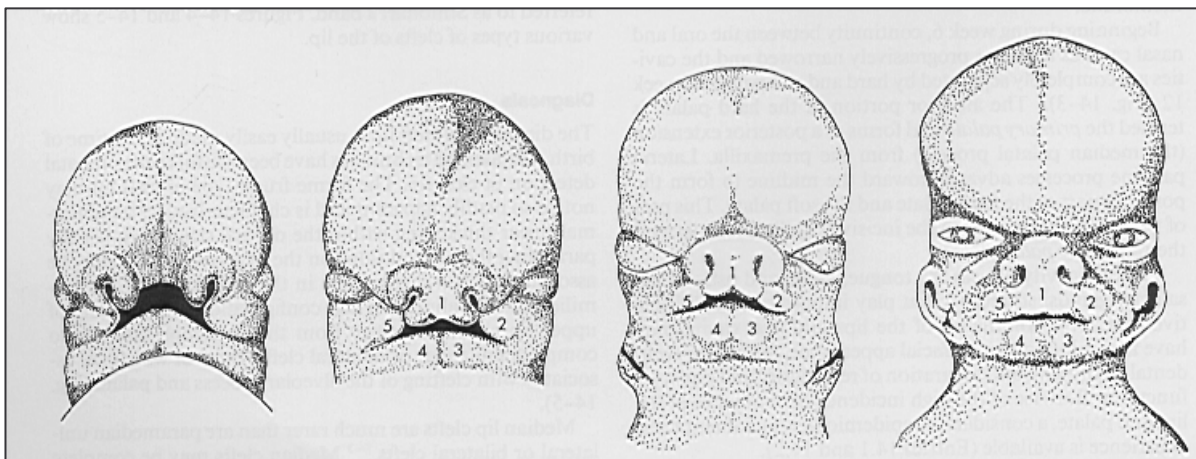


Figura 1. Desenvolvimento do lábio, demonstrando que o lábio é composto pelos processos frontonasal (1), maxilar esquerdo (2), mandibular esquerdo (3), mandibular direito (4) e maxilar direito (5) (adaptado de Lettieri, 1993)

2.1.2. Desenvolvimento do Palato Secundário

O palato secundário desenvolve-se após a formação do palato primário. As cavidades oral e nasal são separadas até a 12ª semana gestacional. É um componente essencial para a respiração, mastigação, deglutição e fala. O palato secundário é composto pelo palato duro (porção anterior) e palato mole (porção posterior) (Wyszynski,2002).

A formação do palato secundário, no início da sexta semana de gestação, decorre da fusão medial das cristas palatinas, formadas a partir dos processos maxilares (Wyszynski,2002). As cristas palatinas ou processos palatinos inicialmente estão direcionadas para baixo, a cada lado da língua. A porção anterior do palato duro forma-se como uma extensão da pré-maxila (processo palatino medial). Com o contínuo crescimento, ocorre um rebaixamento aparente da língua,

permitindo que os processos palatinos laterais avancem em direção à linha média formando a parte posterior do palato duro e o palato mole, fundindo-se entre si e com o palato primário constituindo o palato secundário (figura 2) (Ten Cate, 2001; Katchurian, 2004).

A movimentação e o fechamento dos processos palatinos envolvem uma força intrínseca cuja natureza não foi claramente determinada. Sugere-se que há relação com a grande quantidade de proteoglicanos e de fibroblastos contráteis da região. Outro fator envolvido com o fechamento do palato secundário é o deslocamento da língua do espaço entre as cristas palatinas devido ao padrão de crescimento da cabeça (Ten Cate, 2001; Katchurian, 2004).

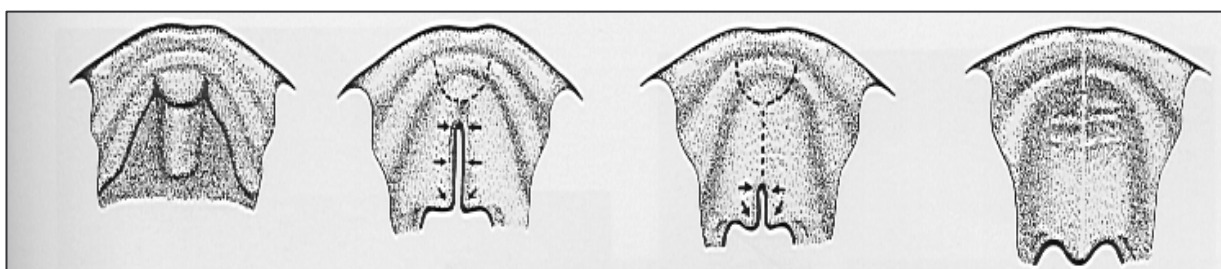


Figura 2. Fechamento esquemático do palato secundário (adaptado de Lettieri, 1993).

2.2. Epidemiologia

As Fissuras Orais (FO) ocorrem devido à formação incompleta do lábio e/ou palato no processo da embriogênese facial. A FO compreende, em geral, uma malformação isolada, isto é, não sindrômica, porém pode estar associada a outras malformações, constituindo FO sindrômicas. Em estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre 77,3% dos casos analisados eram de FO não sindrômicas e 22,7% dos casos apresentavam outras anomalias associadas (Félix et al., 2002).

Compreende uma das anomalias congênitas mais frequentes na espécie humana. A prevalência mundial é de 1 a cada 600 nascidos vivos (Mossey et al, 2002). A variabilidade étnica demonstra associação com a prevalência de fissuras orais (Vieira et al., 2006). A incidência em descendentes de europeus é de aproximadamente 1 em cada 1000 recém-nascidos. Em asiáticos é em torno de 2 em cada 1000 recém-nascidos, sendo a menor incidência em afrodescendentes: 0,41 por 1000 recém-nascidos (Gorlin et al, 2001; Mossey, 2002).

Devido às estruturas embriológicas distintas na gênese do lábio e palato, em geral as fissuras orais não sindrômicas são divididas em dois grupos: fissura labial associada ou não a fissura de palato (FL/P) e fissura de palato isolado (FPI) (figura 3) (Vieira, 2006; Mossey, 2009).

A prevalência da FL/P, em geral, é de 1 em cada 1000 recém-nascidos. Na América Latina a incidência é de 1,11 em cada 1000 recém-nascidos e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) é de 1,2 em cada 1000 nascimentos (ECLAMC, 2001).

A FPI é menos frequente que FL/P, tendo uma prevalência global de 0,65 por 1000 nascimentos. A incidência de palato fendido na América Latina é 0,36 por 1000 recém-nascidos e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre de 0,38 por 1000 recém-nascidos (ECLAMC, 2001).

A fissura labial é mais frequente no sexo masculino que no feminino, numa razão de 2 para 1. É mais comum no lado esquerdo que no lado direito da face, sendo a razão de fissura labial unilateral esquerda, unilateral direita e bilateral de 6:3:1. Vinte e um por cento dos casos envolve fissura labial isolada, 46% fissura labial associada à fissura palatina e 33% fissura palatina isolada (Gorlin,2001).

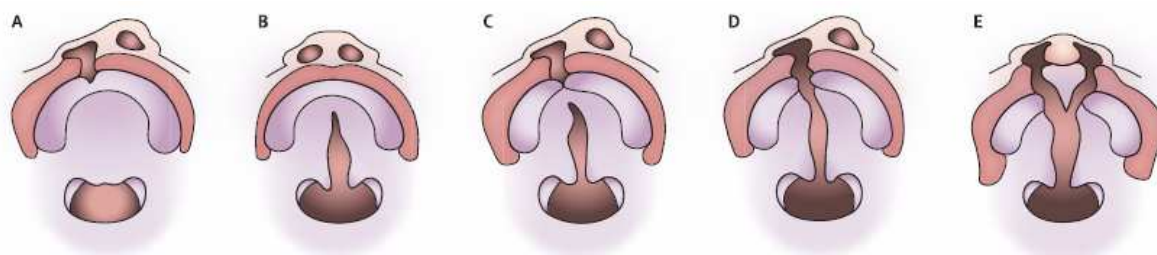


Figura 3. Fissuras orais não sindrômicas: (A) Fissura de Lábio, (B) Fissura de Palato, (C) Fissura de Lábio e Palato unilateral incompleta, (D) Fissura de Lábio e Palato unilateral completa e (E) Fissura de Lábio e Palato Bilateral completa. (adaptado de Mossey et al., 2009)

2.3. Etiologia

As FO apresentam etiologia multifatorial associando fatores genéticos e ambientais.

A hipótese genética para as fissuras orais tem se modificado ao longo do tempo. Inicialmente FPI era considerada de herança autossômica dominante com penetrância reduzida enquanto FL/P era possivelmente transmitida por um gene de penetrância variável de maneira dominante ou recessiva. Posteriormente, um modelo de variabilidade contínua foi sugerido, em um mecanismo poligênico ou de locus único (Wyszynski , 1996).

Comparado com outras anomalias congênitas, as FO tem uma alta taxa de recorrência familiar (Jugessur et al., 2009). Mitchell e Risch (1992) reanalisaram padrões de recorrência de vários estudos familiares para verificar o potencial de envolvimento de um gene maior na etiologia desta malformação. Os autores observaram um declínio no risco de parentes em segundo e terceiro grau e diferença entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos, consistente com um modelo de múltiplos loci.

Um em cada 5 casos de FO em diferentes populações tem história familiar positiva sugerindo um componente genético (Gorlin, 2001; Carini et al., 2007). A hipótese é que a ocorrência de FO seja atribuída à herança multifatorial com efeito limiar (número mínimo de genes necessários para a manifestação da doença), ou seja a malformação é condicionada por vários genes com efeito fenotípico variável bem como fatores ambientais diversos (Sandrini et al.,2005; Bertoja et al.,2008).

Estudos com gêmeos são informativos quando se trata de herança multifatorial. A concordância na expressão fenotípica entre gêmeos monozigóticos varia de 40% a 60%, sendo que entre os dizigóticos, essa concordância é em torno de 4,2% para FL/P. Estudos com FPI demonstraram que a diferença entre os grupos é menor (35% para gêmeos monozigóticos e 7,8% para dizigóticos), sugerindo uma base genética maior para FL/P que FPI (Gorlin, 2001; Murray et al., 2002; Jugessur et al, 2009).

Outros estudos reafirmaram o modelo oligogênico e sugerem que pelo menos 3 a 4 genes poderiam ser responsáveis pela FL/P, através de componente multifatorial e/ou um gene maior (Farral e Holder, 1992).

2.4. Genes Candidatos para fissura de lábio e ou palato

Desde a década de 80 estudos moleculares têm sido realizados para testar o envolvimento de genes no crescimento dos processos faciais. Acredita-se que há interação, pelo menos parcial, dos seguintes genes: *TGFA*, *TGFB2* e *3 MSX1*, *BCL3*, *RARA*, *MTHFR*, *IFR6*, *BARX1*, *DLX* e *SHH*. O controle molecular dos eventos de fusão que contribuem para a formação do palato primário e lábio parece implicar uma combinação de apoptose e transformação do epitélio mesenquimal, tem sido menos estudado. No entanto, acredita-se que estejam inclusos nesse

processo: os genes *SHH*, *MSX1* e *MSX2*; as proteínas morfogenéticas ósseas e os fatores de crescimento de fibroblasto controlados, em parte, pelo gene *TP63* (Mossey et al., 2009).

Vieira et al (2005) sugerem que mutações pontuais em *FOXE1*, *GLI2*, *JAG2*, *LHX8*, *MSX1*, *MSX2*, *SATB2*, *SKI*, *SPRY2* e *TBX10* podem ser causas raras de fissura labial com ou sem fenda palatina. Mutações pontuais em *FOXE1*, *GLI2*, *MSX1*, *SATB2* e *SPRY2* podem contribuir em 6% para o desenvolvimento das fissuras isoladas, particularmente aqueles com fenótipos mais graves (fissura bilateral de lábio com palato), e o teste de desequilíbrio de transmissão não demonstrou associação com as variantes próximas ou nos genes *MSX2*, *JAG2* e *SKI*.

Zuccherro et al. (2004) realizou um estudo em FO com o gene *IRF6*, responsável pela síndrome de Van der Woude, uma patologia autossômica dominante caracterizada por fissura lábio palatina associada a fístulas no lábio inferior. Neste estudo, variantes polimórficas no gene *IRF6* incluindo o polimorfismo V274I foram estudadas em 10 populações com ascendência na Ásia, Europa e América do sul. Foi encontrada forte evidência de transmissão do alelo da valina (V) em todas as populações ($P < 10^9$). Variações em *IRF6* foram responsáveis por 12 % da contribuição genética para FLP e triplicou o risco de recorrência em famílias que já tiveram uma criança afetada.

Rahimov et al. (2008) encontraram associação de uma variante na região promotora do gene *IRF6* cujo alelo de risco rompe o sítio de ligação do fator de transcrição AP-2 α em fissura de lábio, principalmente em famílias européias.

Em estudo feito por Marazita et al. (2009) encontraram associação de SNPs nos genes *IRF6* (1q32) e *FOXE1* (9q21), além disso os resultados foram mais

significativos quando a região do gene *IRF6* foi associada a indivíduos com fissura palatina isolada, enquanto que a região no gene *FOXE1* foi mais significativa com fissura de lábio e palato.

Recentemente, uma triagem genômica confirmou a associação da região do gene *IRF6* e também de regiões próximas aos genes *MAFB*, *ABCA4* (regiões sem prévio relato) e ao cromossomo 8q24. Este estudo demonstrou que as famílias com ascendência europeia apresentavam maior evidência nos marcadores em 8q24, enquanto que em famílias asiáticas apresentaram fortes evidências de associação com os marcadores para *MAFB* e *ABCA4* (Beaty et al, 2010).

2.5. Fatores ambientais

Na embriogênese, antes da conclusão do palato primário, o processo nasal lateral tem um pico de divisão celular, dessa forma torna-se suscetível à ação dos teratogênicos (Mossey et al., 2009). Estudos revisados por Murray (2002) demonstram que vários fatores ambientais estão envolvidos na FO. Entre eles estão a deficiência nutricional, exposição a fenitoína, ácido valpróico, talidomida, o uso do álcool, do cigarro bem como o uso de pesticidas e herbicidas como a dioxina.

O cigarro contém um grande número de toxinas químicas. O seu uso durante a gestação é um fator de risco para FO. Little (2004) em uma meta análise, sobre a associação do efeito do tabaco materno nas fissuras orais, utilizando dados de 24 estudos de caso controle encontrou um risco relativo de 1,34 (95% IC: 1,25 – 1,34) entre o fumo durante a gestação e FL/P e risco relativo de 1,22 (95% IC: 1,10-1,35) entre o tabagismo materno e FPI.

Outros estudos realizados sobre o efeito do tabagismo e o risco de fissuras orais com os genes relacionados à desintoxicação dos componentes do cigarro

como: N-acetil transferase (*NAT1* e *NAT2*), Citocromo P450 (*CYP1A1*) e S-transferase (*GST*)- demonstraram um efeito de dose resposta no uso de tabaco no primeiro trimestre da gestação (Lie et al., 2008). Em seu estudo, Lie et al. (2008) verificou que o risco variou de 1,6 vezes para fumantes passivas para cerca de 2 vezes quando a mãe utilizava mais de 10 cigarros ao dia. Entre os casos de FL não sindrômica essa evidência não foi significativa, entretanto, quanto à análise das variantes dos genes, neste estudo, não houve associação com FL/P, muito menos a interação com o fumo gestacional foi confirmada. Entretanto, Shi et al.(2007), observaram efeito do fumo nas variantes dos genes *NAT2* e *CYP1A1* ($p=0.00003$) e *GSTT1* ($p<0,001$).

A relação entre o uso de tabaco e o álcool durante o primeiro trimestre de gestação foi demonstrada em vários estudos. Lorente et al (2000), demonstraram um aumento do risco de FL/P com o uso de tabaco materno e o aumento do risco de FPI associado ao álcool, sendo que, o aumento no risco é proporcional à quantidade consumida dessas substâncias. Outros estudos de caso-controle não confirmaram associação significativa entre o consumo de álcool e o número mínimo de cigarros durante o primeiro trimestre de gestação e FLP (Leite et al., 2009; Chevrier et al., 2008).

Altos níveis de álcool consumidos durante a gestação podem comprometer o desenvolvimento fetal. Estudo recente, utilizando modelo animal, evidenciou que a exposição ao álcool em idade gestacional pode afetar a expressão gênica via modificações epigenéticas (metilação do DNA) principalmente na síndrome de álcool fetal (Kaminen-Ahola et al., 2010).

2.6. TGFA

O gene *TGFA* (Transforming growth factor alpha) é um fator de crescimento característico dos mamíferos. Ele está localizado no braço curto do cromossomo 2 na região 2p13. Compreende 80 kilobases de DNA genômico e possui seis exons (Vieira et al., 2006).

Durante o desenvolvimento craniofacial o *TGFA* é um potente mitógeno epitelial. Sua relevância biológica como candidato para FO é amparada por seu padrão de expressão em tecidos palatinos, especialmente na junção mediana e mesênquima subjacente palatino, principalmente no momento da fusão dos tecidos, pois promove a síntese de matriz extracelular e migração de células mesenquimais. (Vieira et al, 2006; Feng et al., 2009; Mossey et al., 2009). Em testes realizados *in vitro*, o gene *TGFA* promoveu síntese de matriz extracelular e migração de células mesenquimais garantindo, assim, a força do palato fusionado (Vieira et al., 2006).

Em 1989, Ardinger et al., publicaram o primeiro estudo de associação de genes candidatos e FL/P. Os autores comparam em um grupo de 80 indivíduos com FL/P e 120 controles, a frequência de 12 fragmentos polimórficos de restrição (RFLP) de 5 diferentes loci: fator de crescimento transformador alfa (*TGFA*), fator de crescimento epidermal, receptor do fator de crescimento epidermal, receptor de glicocorticóide e receptor de estrogênio. Os resultados demonstraram uma associação entre dois RFLP do gene *TGFA* (alelo C2 no sítio de restrição da Taq I e o alelo A2 no sítio da BamHI). Desde então, vários trabalhos foram publicados demonstrando uma associação entre *TGFA* e FL/P (Chevenix-Trench et al., 1992; Holder et al., 1992; Hwang et al., 1995; Sassani et al., 1993), enquanto outros não confirmaram esta associação (Stoll et al., 1992; Jara et al., 1995, Shaw et al., 1996;

Bertoja et al.,2008). O alelo C2 no sítio de restrição da Taq I, corresponde a deleção de quatro pares de bases (TAAT). Aparentemente, tal polimorfismo do *TGFA*, não necessariamente indica presença de FL/P ou FPI, porém auxilia na caracterização do fenótipo, como em casos de fissuras incompletas ou completas e até mesmo na uni ou bilateralidade (Bertoja et al., 2008).

Em estudos relacionados na população brasileira, Passos-Bueno et al. (2004) não encontraram associação entre a deleção do alelo C2 e FL/P ou FPI em estudo comparando três centros: São Paulo, Bauru e Ceará. O mesmo resultado foi obtido por Bertoja et al. (2008), numa análise de FL/P ou FPI na população do Rio Grande do Sul.

Apesar dos resultados conflitantes, o gene *TGFA* parece ter um papel importante em alguns grupos, principalmente quando associado a fatores ambientais. Hawng et al. (1995) estudaram o efeito do uso de tabaco materno ao alelo C2 do gene *TGFA*, observando uma razão de chance significativa em FPI para usuárias leves de tabaco, isto é, menos de 10 cigarros por dia (RC: 6,16; 95% IC 1,09-34,7) e também para usuárias moderadas a pesadas de tabaco (RC: 8,69; 95% IC 1,57-47,8). Shaw et al. (1996) confirmaram estes dados para FL/P (RC: 6,5; 95% IC: 1,3-35,2) e FPI (RC: 9,2; 95% IC: 1,6-59,1) quando as mães usaram mais de 18 cigarros ao dia. Romitti et al. (1999) não confirmaram a associação entre o alelo C2 e uso de tabaco materno em FL/P, assim como Zeiger et al. (2005) que confirmaram apenas para FPI (tabela 1).

Tabela 1: Resultados de estudos relacionando o polimorfismo *TGFA*/ TaqI com o uso do tabaco durante a gestação

Autores (Local do estudo)	Fenótipo / genótipo da criança	Quantidade de cigarros por dia	Associação com fumo
Hawng et al. (Maryland / EUA)	FPI /C2C2	Menos de 10	Sim (OR: 6,16; 95% IC 1,09-34,7)
		Mais de 10	Sim (OR: 8,69; 95% IC:1,57-47,8)
Shaw et al (Califórnia/EUA)	FLP /com pelo menos um alelo C2	Menos de 18	Sim (OR: 6,5; 95% IC: 1,3-35,2)
	FPI /com pelo menos um alelo C2	Mais de 18	Sim (OR: 9,2; 95% IC: 1,6-59,1)
Romitti et al. (Iowa/EUA)	FLP /com pelo menos um alelo C2	-	Não
Zeiger et al (Meta analise)	FPI /com pelo menos um alelo C2	-	Sim (OR:1,95; 95% IC:1,22-3,10)

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o papel do polimorfismo *TGFA*/ Taq I e fatores ambientais em fissuras orais não sindrômicas.

3.2. Específicos

3.2.1. Avaliar a associação do polimorfismo TaqI do gene *TGFA* em Fissuras orais não sindrômicas.

3.2.2. Analisar os fatores ambientais como uso de álcool e tabaco durante a gestação em Fissuras Oraís não sindrômicas.

3.2.3. Avaliar a interação do polimorfismo *TGFA*/ TAq I e dos fatores ambientais maternos em pacientes com fissura orais não sindrômicas.

4. ARTIGO

O Artigo será submetido a The Cleft Palate-Craniofacial Journal

Association of *TGFA*/TaqI polymorphism and environmental factors in non-syndromic oral clefts in Southern Brazil.

Liliane Todeschini de Souza^{1,3}, Thayne Woycinck Kowalski¹, Ana Paula Vanz², Roberto Giugliani^{2,3,4} and Têmis Maria Félix^{1,2}.

¹ Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

² Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³ Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

⁴ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Brazil

Address correspondence:

Têmis Maria Félix

Serviço de Genética Médica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: 55 51 3359 8011

Fax: 55 51 3359 8010

Email: tfelix@hcpa.ufrgs.br

Acknowledgment: This study was sponsored by FIRCA/NIH (TW007644-02)

Running Title: *TGFA*/Taq I polymorphism in oral clefts

Association of *TGFA*/TaqI polymorphism and environmental factors in non-syndromic oral clefts in Southern Brazil

Abstract:

Objective: to evaluate the association of *TGFA*/TaqI polymorphism and environmental factors in non-syndromic oral clefts

Design and Setting: case-control study

Participants: Data was collected from 175 non syndromic clefts case-parent triads recruited at the Cranio facial unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Interventions: DNA was extracted from peripheral blood. *TGFA*/Taq I polymorphism was analyzed by PCR/RFLP with Taq I restriction enzyme. A questionnaire was used for gathering data on environmental factors.

Results: We did not find evidence of association between the *TGFA*/TaqI polymorphism and clefting. We also did not find association with *TGFA*/TaqI polymorphism and environmental factors (alcohol and/or tobacco) in non-syndromic oral cleft.

Conclusion: There is no evidence that *TGFA*/TaqI polymorphism play a role in clefting in our population. We also did not find evidence of tobacco and alcohol exposure in clefting, however the low prevalence of those environmental factors in our population could contribute to these findings.

Key words: *Oral clefts, Environmental factors, TGFA/TaqI polymorphism*

Introduction

Orofacial clefts are the most common craniofacial birth defects in humans, with an average worldwide prevalence at birth of 1 / 600 (Mossey and Little, 2002).

They represent a significant public health problem both in terms of the immediate and long-term medical and economic burdens as well as the social impact on patients and their families (Berk and Marazita, 2002). Affected children need multidisciplinary care from birth until adulthood and have higher morbidity and mortality throughout life (Mossey et al., 2009).

Non-syndromic orofacial clefts, which include cleft lip (CL), cleft lip and palate (CLP), and cleft palate only (CP), comprise a range of disorders affecting the lips and oral cavity, resulting in disorders of speech, hearing, appearance, and cognition.

Development of the lip and palate entails a complex series of events that require close coordination of programmers for cell migration, growth, differentiation, and apoptosis. Oral clefts result from a failure of these normal developmental processes (Mossey et al., 2009)

Oral Cleft development mechanism shows that the cleft lip differs from the formation of cleft palate (Vieira, 2006).

Cleft lip is most frequent in males, and cleft palate in females. The prevalence of clefting varies according to the presence of additional malformations, number of affected siblings in a family and ethnic origin. (Mossey et al., 2009).

Non-syndromic oral cleft seems to present a more complex etiology than that of Oral Cleft associated with a given syndrome. It is caused by a multifactorial inheritance including both genetic and environmental factors (Sull et al., 2009). Epidemiological and experimental data suggest that environmental risk factors might be important in cleft lip and palate. Among these environmental factors are poor nutrition, exposure

to medicinal drugs such as phenytoin, thalidomide and maternal exposure to tobacco smoke and alcohol (Mossey et al., 2009; Shi et al. 2008). The association between maternal tobacco smoking and oral cleft risk has been widely investigated. Despite some disparities, studies report moderate but statistically significant associations, especially for cleft lip with/without cleft palate (Wyszynski et al., 1997; Little et al., 2004).

Transforming growth factor alpha (*TGFA*) gene is a well-studied candidate gene for oral cleft. Ardinger et al. (1989) provided the first evidence for association between specific *TGFA* alleles and non-syndromic cleft lip and/or palate (CL/P) in a Caucasian population in the state of Iowa.

TGFA is known to be expressed during craniofacial development (Chevrier et al, 2008). This protein can act as a normal embryonic version of the EGF-related growth factor and is considered to be a powerful epithelial mitogen. The *TGFA* gene acts synergistically with *TGFB* protein promoting in vitro cell proliferation (Vieira and Orioli, 2001).

It has been mapped to chromosome 2p13, comprises 80 kilobases of genomic DNA, and consists of six exons (Vieira, 2006) coding for a polypeptide formed by 50 amino acids (Vieira and Orioli, 2001).

The *TFGA* gene shows a restriction fragment length polymorphism when treated with *Taq I* restriction enzyme. The mutant allele shows a four-base (TAAT) deletion leading a 178-base pair (bp) C1 allele to a 174-bp C2 allele (Tanabe et al., 2000).

TGFA/Taq I polymorphism is located on intron 5 and has 602 bp in the 5' direction of the acceptor site of exon 6 (Vieira, 2006).

Despite conflicting results, the *TGFA* gene seems to have an important role in clefting, especially when associated with environmental factors. Some studies have

tested the *TGFA* gene for potential gene–environmental association (Vieira, 2006; Sull et al., 2009). The aim of this study was to evaluate the association of *TGFA* / TaqI polymorphism in non-syndromic oral clefts. We also analyzed the interaction of this polymorphism with environmental factors such as alcohol and tobacco during pregnancy.

Subjects and methods

The research was approved by The Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Case-parents triads were recruited from the Craniofacial Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). They were included in this study when presenting non-syndromic cleft lip, cleft lip and palate or cleft palate only, not associated with any other birth defect or syndrome.

Data was collected from 175 case-parent triads (96 complete case-triad: proband, father and mother and 79 incomplete case-parents: proband, father or mother).

Informed consent was obtained from each subject. All probands were examined clinically in detail to discard any type of associated malformation and were classified as having non-syndromic oral cleft. A questionnaire was used for gathering data on environmental factors (first-trimester maternal use of alcohol and tobacco) as well as consanguinity, family history of malformation and mother's medical history.

Blood sample was taken via venipuncture from the subjects and collected in EDTA tubes. DNA was extracted from the blood sample using extraction kit according to manufacturer instructions (Gentra Puregene Kit®).

TGFA/Taq I polymorphism was determined by polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction-enzyme digestion. The primers used were 5`- TCACTTCCCCTTTTTCATCTG–3` (forward primer) and 5`-

CGAGGAGGCTCCTGAGGTG-3` (reverse primer). The PCR was carried out in a total volume of 25 μ L containing 10 μ M of each primer, 10 μ M of desoxynucleotide triphosphate, 50 μ M of MgCl₂, 1.5 units of Taq polymerase, and 20 ng/ μ L of genomic DNA. The PCR conditions consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 minutes, followed by 36 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 56°C for 30 seconds and extension at 72°C for 10 seconds, and a final extension cycle at 72°C for 5 minutes. The amplified DNA fragments were digested with 10 units of Taq I restriction enzyme and buffer (Invitrogen™), at 65°C for 3 hours. The fragments were visualized by 2% agarose-gel electrophoresis. The TGFA/Taq I polymorphism creates a restriction site due to a TAAT deletion. The C1 allele has one fragment of 178 bp and the C2 allele has two fragments of 122 and 52 bp.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed with the transmission disequilibrium test (TDT) using FBAT software (Family Based Association Test) (Rabinowitz and Laird, 2000) to evaluate the association of oral cleft with TGFA/TaqI polymorphism. Fisher exact test was used to evaluate all sets of comparisons. P values lower than 0.05 were considered significant.

Results:

Of 175 probands, 91 (52%) were males and 84 (48%) were females. Cleft Lip with or without Palate was more frequent in males (56.5%), however in CP was more frequent in female (71.4%). The highest proportion of the cases were CL/P (147 cases) followed by CP (28 cases) (Table 1).

Table 2 shows the distribution of the genotype frequency of *TGFA*/*TaqI* polymorphism in the probands, mothers and fathers. The allele frequencies of the C1 and C2 alleles were 0.935 and 0.064 respectively. The transmission disequilibrium test (TDT) for *TGFA*/*TaqI* polymorphism, were not statistically significant for oral clefting (MAF(C2)= 0.064 p= 0.335).

Regarding the environmental factors, we observed 17 cases of maternal consumption of tobacco and 8 cases of alcohol during pregnancy (Table 3). When compared environmental factors in exposed and non exposed children with proband's genotypes we did not find significant difference between these groups for both alcohol (p=0,588) and tobacco (p=0,606) (Table 3).

Comparison of proband's phenotype and environmental factors did not show significant difference between CLP and CPO groups according to alcohol (p=0,625) and tobacco used during pregnancy (p=0,466)(Table 3).

Discussion:

This study evaluated the association between *TGFA*/*TaqI* polymorphism and two common environmental exposures (maternal cigarette smoke and alcohol consumption during pregnancy) and both CL/P and CP.

Our study data showed that CL is more frequent in males and the CP is more frequent in females. We also observed a higher prevalence of cases of CL/P than CP. These data is in accordance with the literature (Gorlin, 2001).

The *TGFA* C2 allele frequency varies among different populations, apparently with the highest values in Danish, Japanese, and African-American population, even though the data on this last group was based on a small sample size (Mitchell, 1996; Christensen et al., 1999). Several studies in European populations have shown an

association between the *TGFA*/Taq I polymorphism and CLP. (Arginder et al, 1989; Hwang et al., 1995; Shaw et al, 1998; Tanabe et al, 2000; Jugessur et al., 2003). In our study we did not find any evidence of association between the *TGFA*/TaqI polymorphism and oral cleft. Other studies performed in the Brazilian population also did not find association between the rare *TGFA* C2 allele and CL/P (Passos-Bueno et al., 2004; Bertoja et al. 2008).

TGFA/TaqI polymorphism is predominantly found in European populations. The Brazilian population represents an ethnic admixture of three different populations: Europeans, Africans, and Amerindians, making it very difficult to correlate the ethnicity of cases and controls in our population. However the TDT approach used in this study tends to avoid population stratification.

Advances in molecular and cellular biology have opened multiple avenues for exploring tobacco's and alcohol's action mechanisms on prenatal development. Tobacco smoke contains a large number of toxic chemicals. Maternal smoking is an established risk factor for oral clefts. High levels of alcohol consumption during pregnancy can compromise fetal development. A meta-analysis of 24 studies estimated that mothers who smoked during pregnancy had a 1.3-fold increased risk of having a baby with cleft lip with or without cleft palate, and a 1.2-fold risk of cleft palate alone (Little et al, 2004). In other study, Lorente et al. (2000) showed an increased risk of cleft lip with or without cleft palate associated with smoking and an increased risk of cleft palate associated with alcohol consumption. However, we did not find significant association between environmental factors (alcohol and/or tobacco) and clefting in our population. These results could be due to a small sample size, specially the low number of children exposed to environmental factors in our population.

When compared environmental factors with proband's genotypes we did not find significant association between these groups. We also did not have any case of C2C2 genotype in children exposed to alcohol or tobacco during pregnancy. Several studies also did not confirm the association between the C2 allele and maternal tobacco use in CLP or CP (Romitti et al. 1999.; Zeiger et al. 2005). Hawng et al. (1995) studied the effect of maternal tobacco use and allele C2 of the *TGFA* gene, observing an odds ratio significantly in CP for low users of tobacco (less than 10 cigarettes per day) (RC: 6,16; 95% IC 1,09-34,7) and also to moderate to heavy users of tobacco (RC: 8,69; 95% IC 1,57-47,8). Shaw et al. (1996) confirmed these data for CLP (RC: 6,5; 95% IC: 1,3-35,2) and CP (RC: 9,2; 95% IC: 1,6-59,1) when mothers used more than 18 cigarettes a day.

In summary, there was no evidence that *TGFA*/TaqI polymorphism play a role in clefting in our population. Identification of other genes factors involved in the development of the human craniofacial region will help to better understand the genetic factor involved in clefting. We also did not find evidence of tobacco and alcohol exposure in clefting, however the low prevalence of those environmental factors in our population could contribute to these findings.

References:

Ardinger HH, Buetow AH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, MurrayJC. Association of genetic variation of the transforming growth factor alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet.* 1989;45: 348–353.

Berk NW, Marazita ML. The costs of cleft lip and palate: personal and societal implications. In: Wyszynski DF, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment.* New York: Oxford University Press, 2002: 458–67.

Bertoja, A.E.; Alho, C.S.; França, E.; Menegoto, B. Robinson, W.M.; *TGFA*/TaqI polymorphism in nonsyndromic cleft lip and palate patients from Rio Grande do Sul, Brasil. *Cleft Palate-Craniofacial Journal.* 2008; 45(5):539-544.

- Chevrier, C.; Bahuau, M.; Perret, C.; Iovannisci, D.M.; Nelva, A. Herman, C.; Vazquez, M.; Francannet, C.; Robert-Gnansia, E.; Lammer, E.; Cordier, S. Genetic susceptibilities in the association between maternal exposure to tobacco smoke and the risk of nonsyndromic oral cleft. *Am J of medical Genetics*. 2008; 14(A):2396-2406.
- Christensen K, Olsen J, Norgaard-Pedersen B, Basso O, Stovring H, Milhollin-Johnson L, Murray J. Oral clefts, transforming growth factor alpha gene variants, and maternal smoking: a population-based case-control study in Denmark, 1991–1994. *Am J Epidemiol*. 1999;149:248–255.
- Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekam RCM. Syndromes of the head and neck. *Oxford Monographs on Medical Genetics*. 2001; 42(4)
- Hwang SJ, Beaty TH, Panny SR, Street NA, Joseph JM, Gordon S, McIntosh I, Francomano CA. Association study of transforming growth factor alpha (TGF α) TaqI polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects. *Am J Epidemiol*. 1995; 141: 629-36.
- Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, Vindenes HA, Abyholm F. Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3 and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a caseparent triad analysis. *Genet Epidemiol*. 2003; 24:230–239.
- Little, J.; Cardy, A.; Munger, R.; Tobacco smoking and oral cleft: a meta-analysis. *Bull world health organ*. 2004; 82(3): 213 – 218.
- Lorente, C.; Cordier, S.; Goujard, J. Aymé, S.; Bianchi, F. Calzolari, E.; Walle, H.E.K.; Knill-jones, R. Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral cleft. *Am. J. Public Health*. 2000; 90:415-419.
- Mitchell LE. Transforming growth factor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate; a reappraisal. *Genet Epidemiol*. 1996;14: 231–240.
- Mossey PA, Little J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: Wyszynski DFE, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment*. Oxford University Press: New York, NY, 2002: 127–144.
- Mossey P.A. Little, J.; Munger, R.G.; Dixon, M.J.; Shaw, W.; Cleft lip and palate; *Lancet*. 2009; 374: 1773-85
- Passos-Bueno MR, Gaspar DA, Kamiya T, Tescarollo G, Rabanéa D, Richieri-Costa A, Alonso N, Araújo B. Transforming growth factor- α and nonsyndromic cleft lip with or without palate in Brazilian patients: results of a large case-control study. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2004; 41(4): 387-391.

Rabinowitz, D.; Laird, N.. A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. *Hum Hered.* 2000;50(4):211-23.

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

Shaw GM, Wasserman CR, Murray JC, Lammer EJ. Infant TGF-alpha genotype, orofacial clefts, and maternal periconceptional multivitamin use. *Cleft Palate Craniofac Journal.* 1998;35:366–370.

Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, Tolarova MM. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor alpha gene variants. *Am J Hum Genetics.* 1996; 58: 551-561.

Shi, M.; George L.W.;Murray, J.C. Review on genetics variants and maternal smoking in the etiology of oral clefts and other birth defects. *Birth Defects Research.* 2008; 84(C): 16-29.

Sull, J.W.. Evidence that *TGFA* influence risk to cleft lip with/ without cleft palate through unconventional genetics mechanisms. *Hum Genet,* 2009

Tanabe A, Taketani S, Endo-Ichikawa Y, Tokunaga R, Ogawa Y, Hiramoto M. Analysis of the candidate genes responsible for nonsyndromic cleft lip and palate in Japanese people. *Clin Sci.* 2000;99: 105–111.

Vieira AR. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2006;163:790–810.

Vieira AR, Orioli IM. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *ASDC J Dent Child.* 2001;68:272–279.

Wyszynski DF, Duffy DL, Beaty TH.. Maternal cigarette smoking and oral clefts: A meta-analysis. *Cleft Palate Craniofac Journal.* 1997; 34:206–210.

Zeiger JS, Beaty TH, Liang KY. Oral clefts, maternal smoking and TGFA: a meta-analysis of gene-environment interaction. *Cleft Palate-Craniofacial Journal.* 2005; 42(1): 58-63.

Table 1: Frequency of cases according to type of clefting and gender

<i>Gender</i>	<i>CL/P n(%)</i>	<i>CP n(%)</i>	<i>Total n(%)</i>
Male	83 (56,5)	8 (28,6)	91 (52)
Female	64 (43,5)	20 (71,4)	84 (48)
<i>Total</i>	147 (100)	28 (100)	

Table 2: Genotype frequency of proband, father and mother

<i>Genotype</i>	<i>Proband n(%)</i>	<i>Father n(%)</i>	<i>Mother n(%)</i>
C1C1	157 (89.6)	81 (82.6)	153 (88.5)
C1C2	16 (9.2)	15 (15.3)	18 (10.4)
C2C2	2 (1.2)	2 (2.01)	2 (1.1)
<i>Total</i>	175 (100)	98 (100)	173 (100)

Table 3: Environmental factors and proband's genotypes and phenotype

		Alcohol			<i>p</i>	Tobacco			<i>P</i>
		<i>No</i>	<i>Yes</i>	<i>total</i>		<i>No</i>	<i>Yes</i>	<i>total</i>	
Genotype	C1C1	150 (95.5%)	7 (4,5%)	157	0.588	141 (89.8%)	16 (4.5%)	157	0.606
	C1C2	15 (93.8%)	1 (6.3%)	16		15 (93.8%)	1 (6.3%)	16	
	C2C2	2 (100%)	zero	2		2 (100%)	zero	2	
	<i>Total</i>	167	8	175		158	17	175	
Phenotype	CL/P	140 (95.2%)	7 (4.8%)	147	0.625	132 (89.8)	15 (10.2%)	147	0.466
	CP	27 (96.4%)	1 (3.6)	28		26 (92.9%)	2 (7.1%)	28	
	<i>Total</i>	167	8	175		158	17	175	

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A etiologia das fissuras orais é complexa, com a contribuição de componentes genéticos e ambientais variando de acordo com a região geográfica e o nível sócio econômico. Diversos genes candidatos para FO foram sugeridos nos últimos anos.

Os genes candidatos a Fissuras orais tem sido sugeridos através de resultados de estudos biológicos em modelos animais, de estudos de ligação e de desequilíbrio de transmissão demonstram a sua importância durante o desenvolvimento embrionário (Murray, 2002).

O gene *TGFA* foi associado a FO em vários estudos, sendo que o polimorfismo *TGFA/TaqI* parece ter um papel importante em algumas populações, principalmente quando associado a fatores ambientais (Arginder et al, 1989; Hwang et al., 1995; Shaw et al, 1998; Tanabe et al, 2000; Jugessur et al., 2003). Este estudo avaliou a associação entre o polimorfismo *TGFA/TaqI* e FO e a exposição a fatores ambientais como uso de álcool e fumo durante idade fetal .

A frequência alélica de C2 no gene *TGFA* varia entre diferentes populações sendo que estudos em europeus mostraram associação com o polimorfismo *TGFA/TaqI* e FO. No nosso estudo, nós não encontramos associação entre o polimorfismo e Fissuras Orais. Outros estudos em populações brasileiras também não encontraram associação entre o alelo raro e FO (Passos-bueno et al.,2004; Bertoja et al.2008). A população brasileira pode ser considerada uma das mais heterogêneas do mundo, devido à ocorrência do cruzamento étnico entre pessoas de diferentes origens, tais como colonizadores europeus, escravos africanos e índios americanos, levando a baixa frequência deste alelo, dificultando a associação do alelo C2 com FO.

Avanços na biologia molecular e celular tem explorado o mecanismo de ação do álcool e do fumo no desenvolvimento pré-natal. Sabe-se que o cigarro contém uma grande quantidade de substâncias tóxicas e o álcool pode comprometer o desenvolvimento fetal. Vários estudos comprovam a associação destes fatores com as fissuras orais (Little et al, 2004; Lorente et al., 2000). No nosso estudo não foi encontrada evidência que a exposição ao álcool e ao fumo estivesse relacionada com FO, entretanto a baixa prevalência desses fatores na nossa população poderia ter contribuído para este achado. Quanto a análise da relação entre os fatores ambientais e o genótipo do propósito os resultados de estudos semelhantes também são contraditórios. Hawng et al. (1995) e Shaw et al. (1996) encontraram associação entre o alelo raro C2 e FO enquanto que Romitti et al. (1999) e Zeiger et al. (2005) não encontraram esta relação, assim como no nosso estudo. Além disso, nenhum dos nossos propósitos com genótipo C2C2 foi exposto aos dos fatores ambientais analisados neste estudo.

A identificação de outros fatores envolvidos no desenvolvimento craniofacial poderá ajudar a entender melhor os fatores genéticos envolvidos em fissuras orais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ardinger HH, Buentow KH, Bell GI, Bardach J, Van Demark DR, Murray JC. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genetics*. 1989; 45: 348-353.
- Bertoja, A.E.; Alho, C.S.; França, E.; Menegoto, B. Robinson, W.M.; TGFA/TaqI polymorphism in nonsyndromic cleft lip and palate patients from Rio Grande do Sul, Brasil. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2008; 45(5):539-544.
- 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, Moreno LM, Menezes R, Vieira AR, Petrin A, Wilcox AJ, Lie RT, Jabs EW, Wu-Chou YH, Chen PK, Wang H, Ye X, Huang S, Yeow V, Chong SS, Jee SH, Shi B, Christensen K, Melbye M, Doheny KF, Pugh EW, Ling H, Castilla EE, Czeizel AE, Ma L, Field LL, Brody L, Pangilinan F, Mills JL, Molloy AM, Kirke PN, Scott JM, Arcos-Burgos M, Scott AF. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MFAB and ABC4. *Nature genetics*. 2010; 42(6):525-9
- Carini, F. Scapoli, L.; Palmieri, A. Zollino, I.; Pezzetti; Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *International journal of pediatric Otorhinolaryngology*. 2007; 71: 1509-19.
- Chenevix-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG. Cleft lip with and without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *Am J Hum Genetics*. 1992; 51: 1377-1385.
- Chevrier, C.; Bahuau, M.; Perret, C.; Iovannisci, D.M.; Nelva, A. Herman, C.; Vazquez, M.; Francannet, C.; Robert-Gnansia, E.; Lammer, E.; Cordier, S. Genetic susceptibilities in the association between maternal exposure to tobacco smoke and the risk of nonsyndromic oral cleft. *Am J of medical Genetics*. 2008; 14(A):2396-2406.
- ECLAMC. Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas. Boletim Informativo período 1982-1999. 2001.
- Farrall M, Holder S. Familial recurrence-pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate. *Am J Hum Genet*. 1992; 50: 270-277.
- Félix TM, Spritzer D, Bauermann CB, Gerhardt KD, Collares MV. Estudo genético clínico de pacientes com fissura lábio-palatina no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 14º Congresso Brasileiro de Genética Clínica, Ribeirão Preto, SP, 2002.

- Feng, W.; Leach; Tipney, H.; Phang, T. Geraci, M.; Spritz, R.A.; Hunter, L.E.; Williams, T.; Spatial and temporal analysis of gene expression during growth and fusion of the mouse facial prominences. *Plos one*. 2009; 4(12): e8066.
- Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekam RCM. *Syndromes of the head and neck*. Oxford Monographs on Medical Genetics. no 42, Oxford University Press, 4th Edition, New-York, 2001
- Holder SE, Vintiner GM, Farren B, Malcom S, Winter RM. Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genetics*. 1992; 29: 390-392.
- Hwang SJ, Beaty TH, Panny SR, Street NA, Joseph JM, Gordon S, McIntosh I, Francomano CA. Association study of transforming growth factor alpha (TGF α) TaqI polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects. *Am J Epidemiol*. 1995; 141: 629-36
- Jara L, Blanco R, Chiffelle I, Palomino H, Carreno H. Association between alleles of the transforming growth factor alpha locus and cleft lip and palate in the Chilean population. *Am J Med Genetics*. 1995; 57: 548-551.
- Jugessur, A.; Farlie, P.G.; Kilpatrick, N. The genetics of isolated orofacial cleft: from genotypes to subphenotypes. *Oral Diseases*. 2009; 15: 437-453.
- Kaminen-Ahola, N.; Ahola, A.; Maga, M.; Mallitt, K. Fahey, P.; Cox, T.; Whitelaw, E.; Chong, S. Maternal Ethanol Consumption Alters the epigenotype and the phenotype of offspring in a mouse model. *Plos Genetics*. 2010; 6(1): e1000811.
- Katchuburian, E; *Histologia e Embriologia oral: texto, atlas e correlações clinicas*; 2^o ed. Guanabara Koogan. 2004
- Leite, I.C.G.; Koifman, S. Oral clefts, consanguinity, parenteral tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Epidemiology*. 2009; 23(1):31-37
- Lie, R.T.; Wilcox, A.J.; Taylor, J.; Gjessing, H.K.; Saugstad, O.D.; Aabyholm, F.; Vindenes, H. Maternal smoking and oral cleft: The role of detoxification pathway genes. *Epidemiology*. 2008; 19(4):606-615
- Little, J.; Cardy, A.; Munger, R.; Tobacco smoking and oral cleft: a meta-analysis. *Bull world health organ*. 2004; 82(3): 213 – 218.
- Lettieri J. Lips and oral cavity. In *Human malformations and related anomalies*. Stevenson RE, Hall JG, Goodman RM. Oxford Monographs on Medical Genetics. 1993; 27: 367-381.

- Lorente, C.; Cordier, S.; Goujard, J. Aymé, S.; Bianchi, F. Calzolari, E.; Walle, H.E.K.; Knill-jones, R. Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral cleft. *Am. J. Public Health.* 2000; 90:415-419.
- Marazita, M.L.; Lidral, A.C.; Murray, J.C.; Field, L.L.; Maher, B.S.; Goldstein McHenry, T.; Cooper, M.E.; Govil, M.; Daack-Hirsch, S.; Riley, B.; Jugessur, A.; Felix, T.; Morene, L.; Mansilla, M.A.; Vieira, A.R.; Doheny, K.; Pugh, E.; Valencia-Ramirez, C.; Arcos-Burgos, M. 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.
- Mitchell LE, Risch N. Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis. *Am J Hum Genet.* 1992; 51: 323-332.
- Mossey, P.A; Little, J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: D. F. Wyszynski (ED.). *Cleft lip e Palate.* New York: 2002; 127-158.
- Mossey P.A. Little, J.; Munger, R.G.; Dixon, M.J.; Shaw, W.; Cleft lip and palate. *Lancet.* 2009; 374: 1773-85
- Murray JC. Face facts: genes, environment and cleft. *Am J Hum Genetics.* 1995; 57: 227-232.
- Murray, J.C. Gene/environmental causes of cleft lip and/or palate. *Clinical Genet.* Copenhagen. 2002; 61:248-256,
- Passos-Bueno MR, Gaspar DA, Kamiya T, Tescarollo G, Rabanéa D, Richieri-Costa A, Alonso N, Araújo B. Transforming growth factor- α and nonsyndromic cleft lip with or without palate in Brazilian patients: results of a large case-control study. *Cleft Palate-Craniofacial Journal.* 2004; 41(4): 387-391.
- Rahimov, F.; Marazita, M.L.; Visel, A.; Cooper, M.E.; Hitchler, M.J.; Rubini, M.; Domann, F.E.; Govil, M.; Christensen, K.; Bille, C.; Melbye, M.; Jugessur, A.; Lie, R.T.; Wilcox, A.J.; Fitzpatrick, D.R.; Green, E.D.; Mossey, P.A.; Little, J.; Steegers-Theunissen, R.P.; Pennacchio, L.A.; Schutte, B.C.; Murray, J.C.. Disruption of an AP-2 α binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nature genetics, Letters.* 2008.
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype –environment interactions from a population-based case-control study of oral clefts. *Teratology.* 1999; 59: 39-50

- Sandrini, F.A.L; Junior,A.C.C;Beltrão, R.G; Panarello, A.F.; Robinson, W.M, Fissuras Labio palatinas em gêmeos: Relato de caso; Ver. Cir. Traumatol. Bucocomaxilo-fac.,Camaribe; 5(4):43-48, 2005
- Sassani R, Bartlet SP, Feng H, Goldner-Sauve A, Haq AK, Buetow KH, Gasser DL. Associations between alleles of the transforming growth factor- alpha locus and the occurrence of cleft lip. Am J Med Genetics. 1993; 45: 565-569.
- Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, Tolarova MM. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor alpha gene variants. Am J Hum Genetics.1996; 58: 551-561.
- Shi,M.; Christensen, K.; Weinberg C.R.; Romitti, P.; Bathum, L.; Lozada, A.; Morris R.W.; Lovett, Michael; Murray, J.C. Oral cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. The American Journal of Human Genetics. 2007; 80: 76-90.
- Stoll C, Quian JF, Feringold J, Sauvage P, May E. Genetic variation in transforming growth factor alpha: possible association of Bam HI polymorphism with bilateral sporadic cleft lip and palate. Am J Hum Genet. 1992; 50: 870-871.
- Ten Cate, A.R.; Histologia Bucal : Desenvolvimento estrutura e função; Rio de Janeiro; 2001
- Vieira AR. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. Am J Epidemiol. 2006;163:790–810.
- Wyszynski, D.F. Cleft and Palate: From origin to treatment; Oxford University press us, 2002
- Wyszynsky DF, Beaty TH, Maestri NE. Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. Cleft Palate Craniofacial J. 1996; 33: 406-417
- Zeiger JS, Beaty TH, Liang KY. Oral clefts, maternal smoking and TGFA: a meta-analysis of gene-environment interaction. Cleft Palate-Craniofacial Journal. 2005; 42(1): 58-63.
- Zuccherro, T.M.; Cooper, M.E.; Maher, B.S.; Daack-Hirsch, S.; Nepomuceno, B.; Ribeiro, L.; Caprau, D.; Chcristense, K.; Suzuki, Y.; Machida, J.; Natsume, N.; Yoshiura, K.; Vieira, A.; Orioli, I.M.; Castilha, E.E.; Moreno, L.; Arcos-Burgos, M.; Libral, A.C.; Field, L.L.; Liu, Y.; Shi, M.; Johnson, M.K.; Kondo, S.; Schutte, B.C.; Marazita, M.L.; Murray, J.C.. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) Gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. The new England Journal of Medicine. 2004; 351(8):769-780.

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: 524–528.

7. ANEXOS

7.1. Método para identificação do Polimorfismo TGFA/ Taq I

O polimorfismo Polimorfismo TGFA/ Taq I foi identificado através da técnica PCR/RFLP

PCR (polymerase chain reaction):

5`-TCACTTCCCCTTTTTTCATCTG-3` (forward primer)

5`-CGAGGAGGCTCCTGAGGTG-3` (reverse primer)

A PCR foi realizada em um volume total de 20 µL contendo 1.2 µL de dNTP (2mM), 1.2 µL de cada primer (20pmol/ µL), 0,2 µL de TaqPolimerase, 1 µL de DNA (20 ng/ µL) e 12 µL de água bidestilada e deionizada. As condições de amplificação foram desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 36 ciclos de desnaturação 94°C por 30 segundos, anelamento de 56,5 °C por 30 segundos e extensão de 72 °C por 30 segundos. E extensão final de 72 °C por 10 minutos.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms):

Os fragmentos de DNA foram submetidos a clivagem com a enzima de restrição TaqI (InvitrogenTM), essa enzima cliva entre as bases CG.

Foram utilizados 5,5 µL de água bidestilada e deionizada, 1,5 µL de tampão, 0,5 µL de enzima e 7,5µL do produto de PCR . As condições de clivagem foram 3 horas a 65 °C.

Os fragmentos foram visualizados após eletroforese a 95 volt durante 60 minutos em gel de agarose 2%.O polimorfismo TGFA/ TaqI cria uma região de restrição devido a deleção de TAAT. O alelo C1 tem um fragmento de 178 pb e o alelo C2 formam dois fragmentos um de 122pb e 52 pb

7.2. Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Projeto Estudo de genes candidatos para fissura labio-palatina não sindrômica

I. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

A Fissura Lábio-Palatina é um defeito congênito comum na espécie humana, causada por fatores genéticos e ambientais. Em geral, são casos únicos nas famílias, porém em determinadas famílias pode haver repetição do problema. O objetivo deste trabalho é entender as causas desta malformação, o que poderá auxiliar na prevenção destes defeitos no futuro.

II. Procedimentos que serão utilizados:

Serão coletados do filho(a), da mãe e do pai, 5 a 10 ml de sangue. As amostras serão estudadas para análise genética relacionada com fissura lábio-palatina, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As amostras serão armazenadas no Serviço de Genética Médica do HCPA e somente serão utilizadas para este projeto.

III. Riscos ou desconfortos potenciais:

No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias.

IV. Benefícios esperados:

Este estudo poderá beneficiar as famílias, pois há um componente genético nestas anomalias.

V. Procedimentos alternativos:

Eu entendo que eu tive o direito de recusar a participar deste projeto e que minha recusa não afetará de nenhuma maneira o cuidado de meu filho(a) ou de minha família no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

08.11.2004

WZ 04307

VI. Formas de acompanhamento e assistência:

O atendimento clínico e as informações sobre o aconselhamento genético da família serão realizadas pela médica geneticista Têmis Maria Félix. As coletas de sangue serão realizadas por pessoal especializado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Pelo presente Consentimento Informado, declaro que fui esclarecido, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Fui, igualmente, informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- da segurança de que não serei identificado e que se manterá o carácter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade;

O pesquisador responsável por este projeto de pesquisa é Têmis Maria Félix (Fone: 21018011), tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em ____/____/____.

Data: ____/____/____.

Nome e assinatura do Paciente ou Responsável

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

08.11.2006

WK 04307

7.3. Registro de Anomalias Craniofaciais

IDENTIFICAÇÃO		
Nome _____		REG: _____
Residência _____ n° _____ apto _____ Bairro _____		HCPA: _____
Cidade _____ UF: _____ CEP _____ Fone _____		FC: _____
Sexo: (1)M (2)F Id 1 ^a _____ a _____ m Idade: _____ DN __/__/__		
Nome pai: _____ DN __/__/__		IDADE: _____
Nome mãe: _____ DN __/__/__		IDADE: _____

antecedentes gineco-obstétricos

Pré-natal (1)S (2)N (3)Não sabe Uso medicação (1)S (2)N (3) Não sabe _____

ALCOOL:

Bebeu álcool durante os três meses imediatamente antes de engravidar: (1)N (2)S (3)Não sabe

Durante que meses antes de engravidar bebeu álcool: (1) (2) (3)

Bebeu álcool durante a gestação: (1)N (2)S (3)Não sabe

Durante que meses bebeu álcool durante a gestação: (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) meses de gestação

Qual álcool: _____ Quantidade: _____

CIGARRO

Fumou cigarro durante os três meses antes de ficar grávida: (1)N (2)S (3)Não sabe

Durante que meses antes da gravidez fumou: (1) (2) (3) meses antes de engravidar

Fumou durante a gestação: (1)N (2)S (3)Não sabe

Durante que meses da gestação fumou: (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) meses de gestação

Média de cigarros por dia: _____

Gestação (1)<37sem (2)37-41 sem (3)>41 sem (4) Não sabe Parto (1)Normal (2) Cesaria

PN: g C: , cm PC , cm Apgar 5'

Intercorrências peri-natais: (1) S (2) N (3)Não sabe

HISTÓRIA FAMILIAR

Consangüinidade (1)S (2) N (3) Não sabe

Outros casos na família (1)S (2) N (3) Não sabe

Parente afetado (1) 1º grau: gêmeo MZ, DZ, irmão, pai, mãe

(2) 2º grau: tios e tias

(3) 3º grau: primos

(4) Outro

EXAME CLÍNICO:**Classificação de Kriens**

L	A	H	S	H	A	L
l	a	h	s	h	a	L
*	*	*	*	*	*	*
-	-	-	-	-	-	-

Anomalias associadas:

(1) Crânio: _____

(2) Face: _____

(3) Olhos: _____

(4) Orelha: _____

(5) Tórax: _____

(6) Abdômen: _____

(7) Membros: _____

(8) Neurológico: _____

(9) Pele: _____

EXAMES COMPLEMENTARES

- 1) Cariótipo: _____
 - 2) DNA criança: _____
 - 3) DNA mãe: _____
 - 4) DNA pai: _____
 - 5) Outros: _____
-
-

DIAGNÓSTICO FLP

- (1) Não sindrômico
- (2) Sindrômico: _____

ETIOLOGIA

- (1) Cromossômica
- (2) Gênica
- (3) Teratogênese
- (4) Multifatorial
- (5) Desconhecido

ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Risco de recorrência: _____ Data: _____

7.4. Normas da Revista: The Cleft Palate-Craniofacial Journal



The Cleft Palate-Craniofacial Journal

MANUSCRIPT PREPARATION

GENERAL INFORMATION

SCOPE

The Cleft Palate–Craniofacial Journal (CPCJ) is directed to a multidisciplinary readership of clinicians and scientists interested in craniofacial anomalies, including cleft lip and cleft palate. The CPCJ publishes original research articles, clinical reports, brief communications, articles related to new ideas or innovations, letters to the editor, editorials, invited book reviews, and meeting announcements.

CONTACT INFORMATION

Editor: Arshad R. Muzaffar, M.D.

Editorial Assistant: Deborah C. Ogle

Editorial Office: The Cleft Palate-Craniofacial Journal
1504 East Franklin St., Suite 102
Chapel Hill, NC 27514
Phone: (724) 934 - 2260
Fax: (724) 934 - 2280
Email: cleftpalj@aol.com

Office Hours: Monday, Wednesday, Friday 9 am – 4 pm (EST)

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscripts to be considered for publication should be submitted online at www.cpcjournal.org. Manuscripts submitted for consideration must not have been previously published (except as an abstract), and must not be currently under consideration for publication elsewhere.

PERMISSIONS

Submission of a manuscript to the CPCJ is taken as evidence that no portion of the text or figures has been published or submitted for publication elsewhere unless information regarding previous publication is explicitly cited and copyright permission obtained (fax or mail to CPCJ Editorial Office) at the time of manuscript submission. Permission should be obtained for both print and online publication.

PEER REVIEW

Two independent peer reviews are typically solicited. At the discretion of the Section Editor, a third review by a biostatistician may also be solicited. The Editor is responsible for all final decisions regarding acceptance or rejection, recommendations for revision, and final editing. Manuscripts will be evaluated according to various criteria, including scientific methodology, level of evidence, novelty, clarity, and conciseness. Accepted articles

describing novel findings or methods and with high levels of evidence may be advanced in the publication queue at the discretion of the Editor.

All submitted articles are “double-blinded” to ensure an unbiased review. Reviewers will not have access to author names or affiliations. Authors will not have access to reviewer names or affiliations.

MANUSCRIPT PUBLICATION

Publication of material in the CPCJ should not be interpreted as an endorsement of the material contained therein. The publisher will send galley proofs of accepted manuscripts (pdf file) to the corresponding author via email. Corrections and revisions should be returned to the publisher via email as instructed. Authors are responsible for the accuracy of references and statistical computations. The author(s) acknowledge that the publisher reserves the right to charge authors for excessive revisions made to their galley proofs. Publication may be withheld if authors fail to fulfill these financial obligations.

REPRINTS

Reprints in quantities of 100 or more may be ordered from Allen Press, 810 East 10th Street, Lawrence, KS 66044-8897; Telephone: (800) 627-0326 or (785) 843-1235.

COPYRIGHT TRANSFER

All authors must sign the CPCJ copyright transfer form. The form can be downloaded from www.cpcjournal.org (see ‘Information’). The signed form must be received by mail or fax at the CPCJ Editorial Office before an accepted manuscript can be forwarded for publication.

AUTHOR RESPONSIBILITY

The corresponding author is responsible for ensuring that all individuals named as co-authors have made a major contribution to the manuscript. Authorship credit should be based on significant contributions to 1) conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, AND 2) either drafting of the manuscript or critical revision of the manuscript for important intellectual content, AND 3) final approval of submitted manuscript. Each author must declare his or her contribution to the manuscript by signing the copyright transfer form, available at www.cpcjournal.org.

FINANCIAL DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

Authors are required to disclose, in a cover letter accompanying their manuscript, any relevant conflict of interest, including direct or indirect financial interests they may have in the materials or subject matter dealt with in the manuscript. This information will be held in confidence by the Editor during the review process, but at the discretion of the Editor, may be included in publication of an accepted manuscript.

GROUP AUTHORSHIP

The CPCJ allows research groups to be recognized in submitted manuscripts. Authors should identify both the group name and the individual authors who accept responsibility for the article (e.g., Smith A, Johnson R, Williams T; The CleftCran Research Group). The named individuals must meet the full criteria and requirements for authorship as described in the Author Responsibility section above. Other research group members who do not qualify for authorship may be listed in an Acknowledgement.

PATIENT ANONYMITY

The author is responsible for ensuring the protection of a patients’ anonymity. A signed permission form must be submitted for any recognizable individual appearing in manuscript figures. Shading of the eyes is not an acceptable means of rendering an individual unrecognizable. Patient permission forms may be downloaded from the CPCJ website (www.cpcjournal.org; see ‘Information’). If an author chooses to use his/her own institutional

patient permission form, it must include permission to use photographs for all types of publication including but not limited to print, visual, electronic, or broadcast media. Consent forms should be mailed or faxed to the CPCJ Editorial Office.

HUMANS AND ANIMALS IN RESEARCH

For manuscripts describing the results of experimental studies on humans, authors must include a statement in the Methods section of the manuscript that a Human Subjects or Institutional Review Board (IRB) approved the study and that informed consent was obtained. While informed consent might not be required for consecutive case series and/or retrospective chart review reports, these are still considered research given that the objective of your report is to generalize the findings. As such, they require Human Subjects Review Board approval. If a formal IRB is not available, the authors must include a statement in the manuscript that principles outlined in the Declaration of Helsinki were followed. Information regarding the Declaration of Helsinki may be found at www.wma.net/e/ethicsunit/helsinki.htm.

All research involving animals must follow published guidelines for use of laboratory animals (www.apa.org/science/anguide.html). Compliance with these guidelines should be indicated in the Methods section of the manuscript, along with Institutional Review Board approval if appropriate.

MANUSCRIPT PREPARATION

SUBMISSION CATEGORIES

Original Articles: Reports of original clinical or basic science data pertaining to prevalence, causes, mechanisms, diagnosis, course, treatment, and prevention, including systematic reviews and meta-analysis that represent a new contribution to the field.

Case Reports: Case reports presenting new clinical information.

Ideas and Innovations: Short communications related to novel ideas, techniques, methods of assessment, etc.

Brief Communications: Preliminary or limited results (less than 1500 words, up to 3 figures or tables) of original research pertaining to prevalence, causes, mechanisms, diagnosis, course, treatment, and prevention.

Ethics/Health Policy and Perspectives: *Ethical and Legal Reports* are original articles which examine issues of ethics or the law arising in cleft and craniofacial care and research. *Health Policy Reports* are original articles which examine social, political and economic issues arising in cleft and craniofacial care or research. Ethics, legal, and health policy reports are limited to 2000 words. *Perspectives* are typically solicited articles (unsolicited articles will be considered) that provide background and context for an article in the issue in which they appear. Perspectives are limited to 800 words and may include one figure.

Letters to the Editor: Comments in the form of letters that express differences of opinion or supporting views of recently published CPCJ content.

Editorials: Brief substantiated commentaries (less than 1000 words) on subjects of interest to the CPCJ readership. Editorials should be narrative in form.

MANUSCRIPT FILES

Title Page

The Title Page (submitted separately from the manuscript) must include (in the following order):

- Title (maximum 20 words) ; should be informative, relevant, and concise
- Author names with *no more than* three highest attained degrees, in the order that they will appear in print
- Academic rank or position, and institutional affiliation for each author
- Name, address, telephone number, fax number, and email address of the corresponding author, who will receive all editorial communication and reprint requests.
- If applicable, statement that manuscript was presented orally at a professional meeting, including the name, date, and location of the meeting.
- Credits and appropriate grant numbers if the study was supported by an agency.
- Running title (less than 8 words).

To ensure that the article is blinded, please do not include author names or affiliations, or any other identifying information in any portion of the manuscript other than this Title Page.

Manuscript

First Page

The first page of the manuscript text file should include only the title used on the Title Page (above), the abstract, and key words (see below).

Abstract

Original articles and ideas and innovations articles should include a structured abstract of no longer than 250 words (including Key Words) with the following headings and information, as applicable. Structured abstracts of no longer than 150 words should be used for data-based Brief Communications articles.

Structured Abstract:

Objective: State the main question or objective of the study and the major hypothesis tested, if any.

Design: Describe the design of the study indicating, as appropriate, use of randomization, blinding, criterion standards for diagnostic tests, temporal direction (retrospective or prospective), etc.

Setting: Indicate the study setting, including the level of clinical care (for example, primary or tertiary; private practice or institutional).

Patients, Participants: State selection procedures, entry criteria, and numbers of participants entering and finishing the study.

Interventions: Describe the essential features of any intervention, including the methods and duration of administration.

Main Outcome Measure(s): The primary study outcome measures should be indicated as planned before data collection began. If the hypothesis being reported was formulated during or after data collection, this fact should be clearly stated.

Results: Describe measurements that are not evident from the nature of the main results and indicate any blinding. If possible, the results should be accompanied by confidence intervals (most often the 95% interval) and the exact level of statistical significance. For comparative studies, confidence intervals should relate to the differences between groups. Absolute values should be indicated when risk changes or effect sizes are given.

Conclusions: State only those conclusions of the study that are directly supported by data, along with their clinical application (avoiding overgeneralization) and/or whether additional study is required before the information should be used in clinical settings. Equal emphasis must be given to positive and negative findings of equal scientific merit.

(Reproduced with permission from: Haynes RB et al. More informative abstracts revisited. *Ann Intern Med.* 1990;113:69–76).

Key Words: A short list of the key words that reflects the article's content.

Clinical reports should include an unstructured abstract of no longer than 100 words, including Key Words, describing the objective, essential features and uniqueness of the case being presented, and conclusions. Non-data-based Brief Communications and Ethics, Legal, or Health Policy reports should include an unstructured abstract of no longer than 100 words, including Key Words.

Statistics

If a statistical analysis is conducted, explanation of the methods used must precede the Results section in the manuscript. Unusual or complex analysis methods should be referenced.

Units of Measure/ Abbreviations

The metric system is preferred for expressing units of measure. Abbreviations may be used for terms. The full term for each abbreviation should appear at its first use in the text, unless the abbreviation is a standard unit of measure. Abbreviations used in a table must be explained in a footnote below the table. For a list of standard abbreviations, consult the Council of Biology Editors Style Guide (available from the Council of Science Editors,

9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814; <http://www.councilscienceeditors.org/>) or other standard sources.

The table below lists standard accepted abbreviations for typical cleft type classifications and study groups. Other abbreviations may be proposed for classifications and groups not listed.

<u>ABBREVIATION</u>	<u>USED TO DESCRIBE A SUBJECT GROUP THAT INCLUDES:</u>
CL	cleft lip (excludes (1) cleft lip and alveolus, (2) cleft lip and palate, and (3) cleft palate)
CP	cleft palate only (excludes (1) cleft lip and (2) cleft lip and palate)
CLP	cleft lip and palate (excludes (1) cleft lip and (2) cleft palate)
CL±P	cleft lip with or without cleft palate = cleft lip + cleft lip and palate (excludes cleft palate)
CP±L	cleft palate with or without cleft lip = cleft lip and palate + cleft palate (excludes cleft lip)
CL/P	cleft lip and/or cleft palate = cleft lip + cleft lip and palate + cleft palate (no exclusions)
CL±A	cleft lip with or without cleft alveolus = cleft lip + cleft lip and alveolus (excludes (1) cleft lip, (2) cleft lip and palate, and (3) cleft palate)
CP±A	cleft palate with or without cleft alveolus (excludes (1) cleft lip, (2) cleft lip and alveolus, and (3) cleft lip and palate)

TERMS THAT MAY BE ADDED TO THE ABBREVIATIONS ABOVE (IF APPROPRIATE):

i	isolated
I	incomplete
U	unilateral
B	bilateral
SM	submucous

Format

The CPCJ follows guidelines published in the *American Medical Association Manual of Style*. Manuscripts should be typed double-spaced with 1" margins, left justified, and use a standard 12-point font. Pages should be numbered consecutively in the upper right hand corner, beginning with the second page. Do not print a running title. Turn off the word processing program's hyphenation feature and "smart quotes" feature before typing. Headings must be used to designate the major divisions of the manuscript. Up to three levels of headings may be used.

Acknowledgement

Acknowledge all forms of financial support on the title page. List all other acknowledgements in a paragraph at the end of the manuscript.

Citations/References

Single Author Article

Citation: Mantel (1963) or (Mantel, 1963)

Reference: Mantel N. Chi-square tests with one degree of freedom; extensions of the Mantel-Haenszel procedure. *J Am Stat Assoc.* 1963;58:690-700.

Two Author Article

Citation: Rasheed and Munshi (1996) or (Rasheed and Munshi, 1996)

Reference: Rasheed SA, Munshi AK. Electromyographic and ultrasonographic evaluation of the circum-oral musculature in children. *J Clin Pediatr Dent*. 1996;20:305-311.

Three Or More Author Article

Citation: Lilja et al. (2000) or (Lilja et al., 2000)

Reference: Lilja J, Elander A, Lohmander A, Persson C. Isolated cleft palate and submucous cleft palate. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am*. 2000;12:455–468.

Two or more works by the same first author in the same year

Citation: Smith (1975a), Smith (1975b) or (Smith, 1975a) etc

Reference: Smith RC. Long term effects of smoking on fetal development. *Teratology* 1975a;42:75-84.

Monograph

Citation: Bardach (1967) or (Bardach, 1967)

Reference: Bardach J. *Cleft Lip and Palate* (Monograph). Warsaw: Polish Institute of Medical Publications; 1967.

Thesis

Citation: Dowden (1992)

Reference: Dowden PA. The Effects of Listener Training on the Speech Intelligibility of Severely Dysarthric Individuals. Seattle, WA: University of Washington; 1992. Dissertation.

Book

Citation: McWilliams et al. (1990) or (McWilliams et al., 1990)

Reference: McWilliams BJ, Morris HL, Shelton RL. *Cleft Palate Speech*. Philadelphia: BC Decker; 1990: 40-49. (only list pages if specific pages are cited).

Chapter in Book

Citation: Eliason (1990) or (Eliason, 1990)

Reference: Eliason MJ. Neuropsychological perspectives of cleft lip and palate. In: Bardach J, Morris HL, eds. *Multidisciplinary Management of Cleft Lip and Palate*. Philadelphia: WB Saunders; 1990:825–831.

Conference Presentation

Citation: Parke and Sawin (1975) or (Parke and Sawin, 1975)

Reference: Parke RD, Sawin DB. Infant characteristics and behavior as elicitors of maternal and paternal responsivity in the newborn period. Presented at the Meeting of the Society for Research in Child Development; April 1975; Denver, Colorado.

Website

Citation: World Health Organization (2005)

Reference: World Health Organization. International database on craniofacial anomalies. Available at: www.who.int/genomics/anomalies/. Accessed June 27, 2005.

When multiple references are cited simultaneously in the text, they should be arranged in chronological order, for example: (Smith, 1975; Jones et al., 1981; Brown, 1986). References should be double-spaced, and listed in alphabetical order (unnumbered) according to the surname of the first author. For articles with more than ten authors, include only the first ten author names in the reference list, followed by “et al.”.

Figure Legends

A list of figure legends must be included on a separate page at the end of the manuscript article file. The legend should explain each figure in detail. Do not include figure legends in your figure art file.

Tables

Tables should be numbered consecutively using Arabic numerals. Each table should have an appropriate title and explanation at its head. Abbreviations used in a table must be explained in a footnote below the table. Preferably, tables should be submitted electronically as separate files, with one table per file, in either .doc (text) or .xls (spreadsheet) format. Do not include a separate listing of Table titles in the manuscript article file. Tables may be submitted as part of the manuscript article file, with each table placed on a separate page following the references.

Figures

All figures and illustrations must be original photographs or artwork. For figures or illustrations reprinted from published work, the author must obtain permission from the copyright holder and fax or email the permission to the CPCJ Editorial Office. Figures should be numbered consecutively in the order in which they appear in the manuscript, using Arabic numerals. A list of figure legends must be included on a separate page following the body of the manuscript. The legend should explain each figure in detail. Authors will be responsible for the following charges for each color figure submitted: \$75.00 for online only; \$525.00 for both online and print. A single figure may include multiple images (a, b, c, etc.) but all must appear on the same page.

Figures should be submitted in one of the following formats: tif (preferable), eps, jpg, pdf). Each figure should be submitted as a separate file. Composite figures made up of more than one image should be submitted as separate files (e.g. Fig 1A, Fig 1B).

Refer to the Digital Art Specifications document at www.cpcjournal.org (see 'Information') for image resolution, size, and format requirements. For symbols that must be explained, please use a key that can be shot with the figures. Do not include symbols in the figure legend. Authors may be charged if artwork must be generated to incorporate figure symbols into the figure legend.

Figures submitted at lower than the required resolutions stated above will be allowed for review purposes. However, the publication process for accepted manuscripts will be delayed until acceptable images have been submitted.

Video

Video clips that contribute significantly to the manuscript may be submitted in either avi, mov, or mpeg formats. Videos should be submitted at the desired reproduction size and length, but should not exceed 6 MB in size. If submitting avi files, the files must be compressed. Authors are solely responsible for all editing of video clips. Each video file must be accompanied by a still image from the video that conforms to the figure resolution and size requirements outlined above for figures. This image will be published in the print version of the journal in place of the video. Please indicate in the figure legend that the still image has an associated video file. Both the print-version figure and the video must share the same file name (e.g., Figure1.jpg and Figure1.mov). A list of video captions should be prepared on a separate page at the end of the manuscript article file. *Video submissions are strongly encouraged, particularly for articles dealing with surgical techniques.*

Audio

Audio clips that contribute significantly to the manuscript may be submitted in .au, .ram, .wav, or .mp3 formats. Audio files should not exceed 6 MB in length. Authors are solely responsible for all editing of audio clips. Audio clips should be cited in the manuscript as Audio 1, Audio 2, etc. A list of audio file captions should be submitted on a separate page at the end of the manuscript article file.