

ÂNGELA EHLERS BERTOJA

**ESTUDO DE ALELOS DO LÓCUS *TGFA* ENVOLVIDOS NA ETIOLOGIA DAS FISSURAS
LABIOPALATINAS EM AMOSTRA DE PACIENTES NÃO-SINDRÔMICOS
DO RIO GRANDE DO SUL**

Tese apresentada como requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: Profa. Dra. Wanyce Miriam Robinson

Colaboradores: Profa. Dra. Clarice Sampaio Alho

Prof. Dr. Everaldo de França

Porto Alegre
2006

A minha filha Catarina,
razão de todo meu esforço,
dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

por me iluminar e guiar meus passos, concedendo-me força e paz, para que eu pudesse seguir meu caminho sem desanimar.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do seu Diretor, **Marcos Túlio Mazzini Carvalho,**

por viabilizar minha formação profissional e pela possibilidade de realização desta pós-graduação.

À CAPES,

pela concessão da bolsa de estudo que proporcionou a realização deste doutorado.

À Profa. Dra. Wanyce Miriam Robinson,

pela excelente orientação, amizade e dedicação.

Ao Laboratório de Genética da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa da sua coordenadora, **Profa. Dra. Clarice Sampaio Alho,**

pelo oportunidade de utilizar suas instalações e pelo financiamento de minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Everaldo de França,

pela amizade e por ser incansável nos ensinamentos a mim dedicados.

À Profa. Beatriz Menegotto,

pela disposição na coleta e nos exames dos pacientes.

Ao Prof. Raphael Onorino Carlos Loro (in memoriam)

grande idealizador do serviço de atendimento aos pacientes portadores de fissuras labiopalatinas da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, grande amigo e incentivador.

Ao meu marido André Liedke Gick,

pelo amor e incentivo, sem o qual a realização deste sonho não teria sido possível.

Aos meus pais Maria Cristina e Fernando Bertoja,

pela minha formação, educação e pela confiança em mim depositada.

Aos professores e coordenadores do curso de doutorado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial,

pelos constantes empenho e incentivo para nosso aprimoramento profissional.

Aos colegas de doutorado,

Raphael Loro, Gilséia Woitchunas, Elaine Artuso de Mello, Rodrigo Beltrão, Fernando Cauduro, Ricardo Smith, Antônio César Fogaça,

pela convivência e, principalmente, pela amizade construída ao longo desse curso.

À Cladinara Roberts,

pela paciência e pelos ensinamentos da prática no laboratório de genética.

Aos Funcionários da Faculdade de Odontologia,

pela disponibilidade e atenção durante esses quatro anos de convívio.

À minha família,

pelo apoio, incentivo e confiança que me foram depositados.

RESUMO

As fissuras labiopalatinas (FLP) são as malformações craniofaciais mais comuns em seres humanos. Sua etiologia é complexa, envolvendo tanto fatores genéticos quanto ambientais. As fissuras labiopalatinas em pacientes não-sindrômicos (FLP-NS) parecem ter uma etiologia distinta das FLP associadas a alguma síndrome. Desde o final da década de 1980, são realizadas pesquisas com o objetivo de testar genes que atuem na etiologia das FLP-NS, entre eles o *TGFA* (fator transformador de crescimento epitelial alfa).

O objetivo deste trabalho foi testar o polimorfismo *TGFA/Taq I* em pacientes portadores de FLP-NS, comparando os resultados obtidos com uma amostra controle de indivíduos sem fissuras para averiguar a ausência ou a presença da mutação gênica nesse locus. Além disso, foi feita a comparação entre as técnicas de extração de DNA obtidas através de sangue periférico e *swab* bucal.

A extração de DNA a partir de *swab* bucal se mostrou eficaz na determinação genotípica do locus *TGFA* e propícia para a coleta em populações com FLP.

Mutações no gene *TGFA* não estão associadas à FLP-NS na amostra da população do Rio Grande do Sul estudada não sendo, então, possível concluir qual seria o papel do *TGFA* na expressão da FLP-NS.

Palavras-chave: Fissura labiopalatina; Polimorfismo *TGFA/Taq I*; Genética.

ABSTRACT

Cleft lip and palate (CLP) are the most common craniofacial anomalies among humans. This etiology is complex, involving genetic and environmental factors. Non-syndromic cleft lip and palate (NS-CLP) seem to have a distinct etiology of the CLP associated to some syndrome. Since the late 1980's, researches have been carried with the objective to identify genes that act in the etiology of the NS-CLP, amongst them the *TGFA* (transforming growth factor alpha).

The objective of this study was to test the *TGFA/Taq I* polymorphism in patients with NS-CLP, and to compare the results with those gotten in a control sample constituted by individuals without CLP, aiming to identify the inquiring the existence of mutations in this locus. A comparison was carried between enters gotten by the techniques of DNA extraction of buccal swab and peripheral blood.

Extraction of DNA by buccal swab showed itself efficient for the determination genotypical *TGFA* locus and propicia for the collection in population with CLP.

Mutations in *TGFA* gene are not associated to NS-CLP in the population of Rio Grande do Sul studied, therefore it is not possible to conclude which would be the role of the *TGFA* in the NS-CLP expression.

Key words: Cleft lip and palate; *TGFA/Taq I* polymorphism; Genetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representativo do início da formação facial a partir da proeminência frontal, e dos processos maxilares e mandibular.....	18
Figura 2 – Esquema representativo da formação facial no estágio de conformação da cavidade nasal.....	19
Figura 3 – Esquema representativo da formação facial após a fusão da proeminência frontal e dos processos maxilares e mandibular.....	20
Figura 4 – Esquema representativo da palatogênese humana.....	21
Figura 5 - Esquema representativo da formação de fissura labial unilateral.....	23
Figura 6 - Esquema representativo da formação de fissuras labiais e/ou palatinas..	24
Figura 7 – Cariótipo de um indivíduo do gênero feminino (XX), obtido com hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH), mostrando no detalhe o cromossomo 2. Cromossomo 2 com a localização do gene <i>TGFA</i> (2p13).....	34
Figura 8 – Genealogias hipotéticas de família nuclear e estendida.....	38
Quadro 1 – Representação da seqüência de DNA do polimorfismo <i>TGFA/Taq I</i> nos seus dois alelos.....	50
Figura 9 - Representação esquemática e fotografia da análise eletroforética em gel de agarose 2% com brometo de etídio da digestão do gene <i>TGFA</i>	51
Quadro 2 – Distribuição da freqüência dos alelos <i>C1</i> e <i>C2</i> do polimorfismo <i>TGFA/Taq I</i> em diferentes estudos.....	54
Gráfico 1 - Comparação das freqüências genotípicas do polimorfismo <i>TGFA</i> entre os pacientes e o grupo controle na amostra investigada , em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	63
Quadro 3 – Representação de estudos que analisaram o gene <i>TGFA</i> em variadas populações.....	65
Figura 10 - Seqüenciamento de DNA de um indivíduo heterozigoto para o polimorfismo <i>TGFA</i>	67
Figura 11 - Visualização da PCR com as técnicas de extração de DNA através de sangue periférico e <i>swab</i> bucal.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo o genótipo para o polimorfismo <i>TGFA</i> na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	53
Tabela 2 - Distribuição da frequência alélica do gene <i>TGFA</i> nos indivíduos portadores de FLP-NS na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	54
Tabela 3 - Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo o gênero acometido na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	55
Tabela 4 - Distribuição do genótipo para o polimorfismo <i>TGFA</i> em relação ao gênero do indivíduo afetado na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	55
Tabela 5 - Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo a procedência na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	56
Tabela 6 - Distribuição do genótipo para o polimorfismo <i>TGFA</i> em relação à procedência do indivíduo afetado na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	57
Tabela 7 - Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo a presença de outro(s) afetado(s) na família dos pacientes estudados em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	57
Tabela 8 - Distribuição do genótipo para o polimorfismo <i>TGFA</i> em relação à presença de outro(s) afetado(s) na família na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	58
Tabela 9 - Distribuição dos genótipos para o polimorfismo <i>TGFA</i> em relação à consangüinidade entre as famílias do indivíduo afetado na população estudada em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	59

Tabela 10 - Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo o tipo de fissura acometida na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	59
Tabela 11 - Distribuição dos genótipos para o polimorfismo <i>TGFA</i> em relação ao tipo de fissura do indivíduo afetado considerando-se FL/P e FP, na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	61
Tabela 12 - Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo o lado acometido, na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	62
Tabela 13 - Distribuição dos genótipos para o polimorfismo <i>TGFA</i> em relação ao lado da fissura do indivíduo afetado, na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	62
Tabela 14 - Comparação dos genótipos para o polimorfismo <i>TGFA</i> entre os pacientes e o grupo controle na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl – Microlitro

μM – Micromolar

BamH I – Enzima de restrição. Origem: *Bacillus amyloliquefaciens*

BSA – Albumina bovina sérica

BCL3 - Célula do tipo B do linfoma

CERLAP - Centro de Reabilitação de Fenda Labiopalatal

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato

EGF - Fator de crescimento epidérmico

EUA – Estados Unidos da América

FISH – Hibridização *in situ* por fluorescência (do inglês: *Fluorescence in situ hybridization*)

FL – Fissura labial

FL/P – Fissura labial com ou sem envolvimento palatino

FLP – Fissura (ou fenda) labiopalatina (ou labiopalatal)

FLP-NS – Fissura labiopalatina em pacientes não-sindrômicos

FP – Fissura palatina isolada

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS

Hinf I – Enzima de restrição. Origem: *Haemophilus influenza*

HOX – Genes homeobox

IRF6 - Fator regulador do interferon-6

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

mRNA – RNA mensageiro

MSX1 - Proteína homeobox do grupo 7

mtDNA - DNA mitocondrial

MTHFR - 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase

NaCl – Cloreto de sódio

Nco I – Enzima de restrição. Origem: *Norcadia otitides-caviarum*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RARA - Receptor alfa para ácido retinóico

RFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição. (do inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNA – Ácido ribonucléico

SPSS - Programa Estatístico para as Ciências Sociais (do inglês: *Statistical Package for the Social Sciences*)

Taq I – Enzima de restrição que corta o DNA na seqüência TCGA do DNA.

Origem: *Thermus aquaticus*

TBE – Tris, ácido bórico e quelante

TGFA - Gene do fator transformador de crescimento alfa

TGFA – Proteína sintetizada pelo fator transformador de crescimento alfa

TGFB – Fator transformador de crescimento beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	EMBRIOLOGIA DE LÁBIO E PALATO.....	18
3.2	EPIDEMIOLOGIA DAS FLP.....	25
3.3	ETIOLOGIA DAS FLP.....	28
3.3.1	Genética	29
3.3.2	Genes candidatos que atuam na etiologia das FLP	31
3.4	PREDISPONENTES AMBIENTAIS ÀS FLP.....	43
3.5	ACONSELHAMENTO GENÉTICO E TERAPIA GÊNICA.....	45
3.6	COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE DNA ATRAVÉS SANGUE PERIFÉRICO E SWAB BUCAL.....	46
4	METODOLOGIA	48
4.1	PARADIGMA.....	48
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES ESTUDADOS.....	48
4.3	GENOTIPAGEM.....	49
4.4	COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE DNA ATRAVÉS DE SANGUE PERIFÉRICO E SWAB BUCAL.....	51
4.5	SEQÜENCIAMENTO DO GENE <i>TGFA</i>	52
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	FREQÜÊNCIAS GÊNICA E GENOTÍPICA.....	53
5.2	GÊNERO.....	54
5.3	PROCEDÊNCIA.....	56
5.4	RECORRÊNCIA FAMILIAR E CONSANGÜINIDADE ENTRE OS PAIS DOS AFETADOS.....	57
5.5	TIPO DE FISSURA.....	59

5.6	LADO ACOMETIDO.....	61
5.7	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPO DE AFETADOS E O GRUPO CONTROLE EM RELAÇÃO À DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS <i>C1C1</i> , <i>C1C2</i> E <i>C2C2</i>	62
5.8	SEQÜENCIAMENTO DO GENE <i>TGFA</i>	67
5.9	COMPARAÇÃO ENTRE ASTÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA.....	68
6	CONCLUSÕES	70
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido.....	78
	ANEXO B – Ficha clínica.....	81
	ANEXO C - Protocolo de extração de DNA a partir de <i>swab</i> bucal com NaOH.....	83
	APÊNDICE A – Protocolo de extração de DNA através de células sangüíneas.....	84
	APÊNDICE B – Aprovação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS.....	87
	APÊNDICE C - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.....	88
	APÊNDICE D – Publicação no Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (SISNEP).....	89

1 INTRODUÇÃO¹

Os últimos avanços da Genética Molecular e da Bioquímica proporcionaram um progresso importante no conhecimento da estrutura dos genes e no controle genético das enzimas e das proteínas funcionais. A diferenciação celular é um aspecto fundamental no desenvolvimento embrionário, sendo conhecido grande número de mecanismos de regulação e diferenciação da atividade gênica. Porém, permanece sem resposta conclusiva o modo como as células de um embrião em desenvolvimento precoce conseguem diferenciar-se em diversos tecidos.

As informações sobre os fatores genéticos que atuam no início, na direção e na manutenção da embriogênese são limitadas. A partir de estudos com *Drosophila melanogaster* foram identificados vários genes que desempenham papel importante nos processos de desenvolvimento. A maioria desses genes produz proteínas chamadas fatores de transcrição, responsáveis pelo controle da transcrição do RNA, a partir de um molde de DNA. Os fatores de transcrição podem ligar ou desligar genes, ativando ou reprimindo a expressão gênica (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2002).

Estudos recentes revelaram uma grande homologia de genes reguladores do desenvolvimento entre humanos, camundongos e *Drosophila*. Mutações nesse tipo de genes podem resultar em malformações isoladas ou síndromes com anomalias congênitas, em qualquer um desses organismos (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2002).

As fissuras (ou fendas) labiopalatinas (ou labiopalatais) são as malformações craniofaciais mais comuns em seres humanos, variando em prevalência de acordo com fatores étnicos, origem geográfica e situação socioeconômica (SLAYTON et al., 2003). Uma das maiores prevalências dessas malformações é encontrada entre nativos norte-americanos (3,6/1000). Seguem, em menor prevalência, os asiáticos (2,1/1000 – japoneses; 1,7/1000 – chineses), os caucasóides (1/1000) e, por fim, os afro-americanos (0,3/1000) (WYSZINSKI; BEATY; MAESTRI, 1996).

¹ * Texto redigido conforme as normas da ABNT NRB 14724 em vigor a partir de 2006.

Os índios Bari, residentes nas planícies da floresta tropical do oeste da Venezuela e noroeste da Colômbia, possuem a mais alta prevalência já relatada de fissura labial com ou sem fissura palatina (FL/P), onde foram identificados 12 afetados em uma população de aproximadamente 1.200 indivíduos (BALLEW; BECKERMAN; LIZARRALDE, 1993).

A etiologia das fissuras labiopalatinas (FLP) é complexa, envolvendo tanto fatores genéticos quanto ambientais (SLAYTON et al., 2003). Clinicamente, elas causam dificuldades na ingestão de alimentos, desarmonia oclusal e hipoplasia maxilar durante o crescimento. O tratamento efetivo compreende cirurgias reconstrutivas e corretivas e tratamentos ortodôntico e fonoaudiológico associados.

Vários trabalhos relatam a ocorrência de anomalias associadas às FLP. A frequência com que isso ocorre varia de 4,5% (JENSEN et al., 1988) a 63,4% (SHPRINTZEN et al., 1985). Essas variações dependem da população, da amostra e dos métodos utilizados nas diferentes análises. O estudo de uma amostra de 100 pacientes, em atendimento no então Serviço de Defeitos da Face da PUCRS, mostrou que 20% dos pacientes apresentavam anomalias associadas às FLP. Destes, menos de 3% estavam associados a alguma síndrome já conhecida, como por exemplo, as síndromes de Van der Woude, Waardenburg e Treacher Collins (FURLANETO; ROBINSON; BORGES-OSÓRIO, 2003).

As fissuras labiopalatinas em pacientes não-sindrômicos (FLP-NS) parecem ter uma etiologia distinta das FLP associadas a alguma síndrome. Sua etiologia parece ser mais complexa. Não se trata de uma herança mendeliana simples (recessiva ou dominante), atribuída a um único gene ou locus, mas em geral, mostra uma forte agregação familiar, o que denota a existência de um componente genético importante (WYSZINSKI; BEATY; MAESTRI, 1996).

Desde o final da década de 1980, são realizadas pesquisas com o objetivo de testar genes que poderiam atuar na etiologia das FLP-NS. Alguns dos genes estudados são: *TGFA* (fator transformador de crescimento alfa), *TGFB 2 e 3* (fatores transformadores de crescimento beta 2 e 3), *MSX1* (proteína homeobox do grupo 7), *BCL3* (célula do tipo B do linfoma), *RARA* (receptor alfa para ácido retinóico), *MTHFR* (5,10-metilenotetrahidrofolato redutase) e *IFR6* (fator regulador do interferon-6), uns com mais, outros com menos êxito.

O conhecimento de mutações nesses e em outros genes candidatos a atuarem na etiologia das FLP poderá ser importante, não só para um aconselhamento genético seguro, indicando as probabilidades de ocorrência dessas malformações ou recorrência em famílias com um membro já afetado, como também para conseguir, futuramente, através da manipulação gênica, a prevenção dessas malformações faciais.

2 OBJETIVOS

- a. Determinar a frequência dos alelos *C1* e *C2* do polimorfismo *TGFA/Taq I* em uma amostra de pacientes portadores de FLP-NS em uma população do Rio Grande do Sul;
- b. Testar a presença do polimorfismo *TGFA/Taq I* em pacientes com FLP-NS e em uma amostra controle de indivíduos sem fissuras, para averiguar a existência de associação entre mutações gênicas no locus *TGFA* (alelo *C2*) e a malformação;
- c. Comparar as metodologias de extração de DNA de sangue periférico e de células da mucosa jugal coletadas com *swab* bucal, a fim de testar a eficácia desse último método para a determinação genotípica do locus *TGFA* nos pacientes com FLP-NS;
- d. Constituir um banco de DNA de pacientes portadores de FLP-NS, com a finalidade principal de sua utilização neste e em futuros estudos de outros marcadores genéticos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 EMBRIOLOGIA DE LÁBIO E PALATO

A morfogênese de lábio e palato ocorre como resultado de interações complexas entre células, produção de matrizes intercelulares, morte celular programada, diferenciação celular e migração da crista neural. Todas essas interações são controladas por numerosas proteínas estruturais e reguladoras (PRESCOTT et al., 2000).

Os primórdios começam a aparecer no início da quarta semana de vida intra-uterina. Na figura 1 pode ser observado que o desenvolvimento facial ocorre ao redor de um estomódeo primitivo, a partir de proeminências e processos derivados da proliferação de células da crista neural (SCHUTTE; MURRAY, 1999, MOORE; PERSAUD, 2000; STAINER; MOORE, 2004). A proeminência frontal dá origem aos olhos, fronte, nariz, filtro labial e pré-maxila. O par de proeminências ou processos maxilares forma as bordas laterais do lábio superior, a maxila e as bochechas; o processo mandibular forma o lábio inferior, o mento e a mandíbula (MOORE; PERSAUD, 2000).



Figura 1 - Esquema representativo do início da formação facial a partir da proeminência frontal e dos processos maxilares e mandibular.

Fonte: www.forp.usp.br/mef/embriologia/alimentar_respiratorio.htm

O desenvolvimento da face ocorre entre a quarta e a décima segunda semanas de vida intra-uterina. A mandíbula e o lábio inferior são as primeiras partes que se formam, durante a quarta semana. Os processos maxilares aumentam devido à proliferação do mesênquima, crescendo medialmente e deslocando-os um em direção ao outro, bem como ao plano médio (Figura 2). Cada proeminência nasal lateral fica separada do processo maxilar por uma fissura chamada sulco nasolacrimal. Ao final da sexta semana, dá-se a fusão das proeminências nasais e maxilares ao longo da linha do sulco nasolacrimal (MOORE; PERSAUD, 2000).

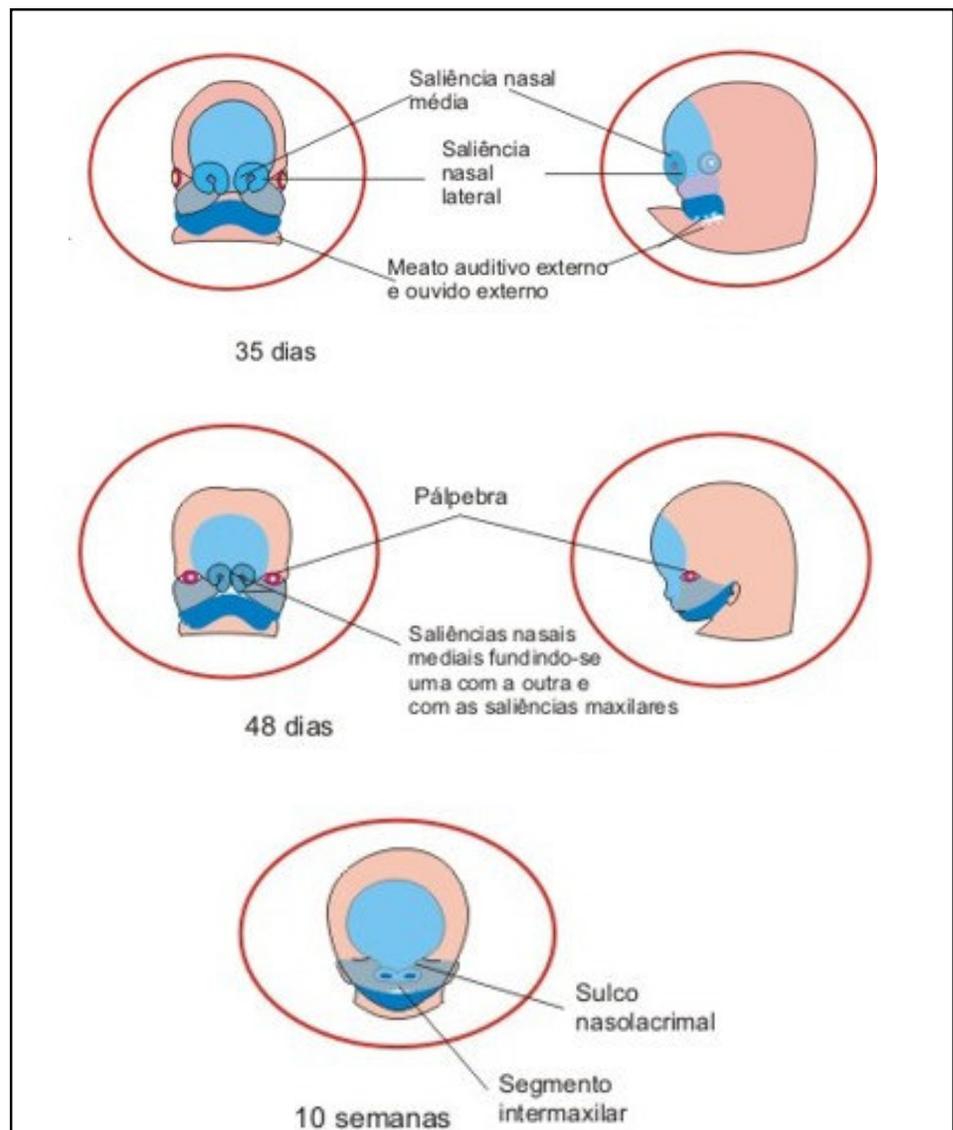


Figura 2 - Esquema representativo da formação facial no estágio de conformação da cavidade nasal.

Fonte: www.forp.usp.br/mef/embriologia/alimentar_respiratorio.htm

Entre a sétima e a décima semanas, as proeminências nasais mediais fundem-se entre si e com os processos maxilares. Isso resulta na continuidade da maxila com o lábio superior e na separação das cavidades nasais e bucais, formando o filtro labial, a pré-maxila e a gengiva a ela associada, bem como o palato primário (porção palatina que compreende a região de canino a canino, indo até o forame incisivo) (Figura 3).

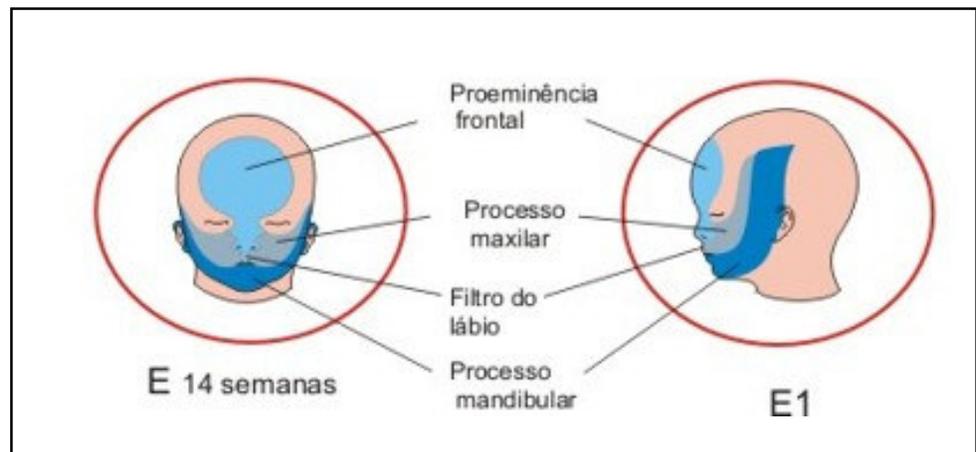


Figura 3 - Esquema representativo da formação facial após a fusão da proeminência frontal e dos processos maxilares e mandibular.

Fonte: www.forp.usp.br/mef/embriologia/alimentar_respiratorio.htm

O palato secundário (primórdios das partes dura e mole do palato que se estendem posteriormente ao forame incisivo) começa a se desenvolver cedo, na sexta semana, a partir de duas projeções mesenquimais das proeminências maxilares, chamadas processos palatinos laterais (Figura 4A e B). Inicialmente, esses processos projetam-se ínfero-medialmente, de ambos os lados da língua (Figura 4C e D). Com o desenvolvimento dos maxilares, a língua fica relativamente menor, deslocando-se inferiormente; é quando os processos palatinos laterais assumem uma posição horizontal superior à língua (Figura 4E e F). Gradualmente, esses processos aproximam-se um do outro, fundindo-se no plano médio com o septo nasal e a parte posterior do palato primário (MOORE; PERSAUD, 2000).

As partes posteriores dos processos palatinos laterais não chegam a ossificar. Elas estendem-se em sentido posterior, para além do septo nasal, fundindo-se para formar o palato mole e a úvula.

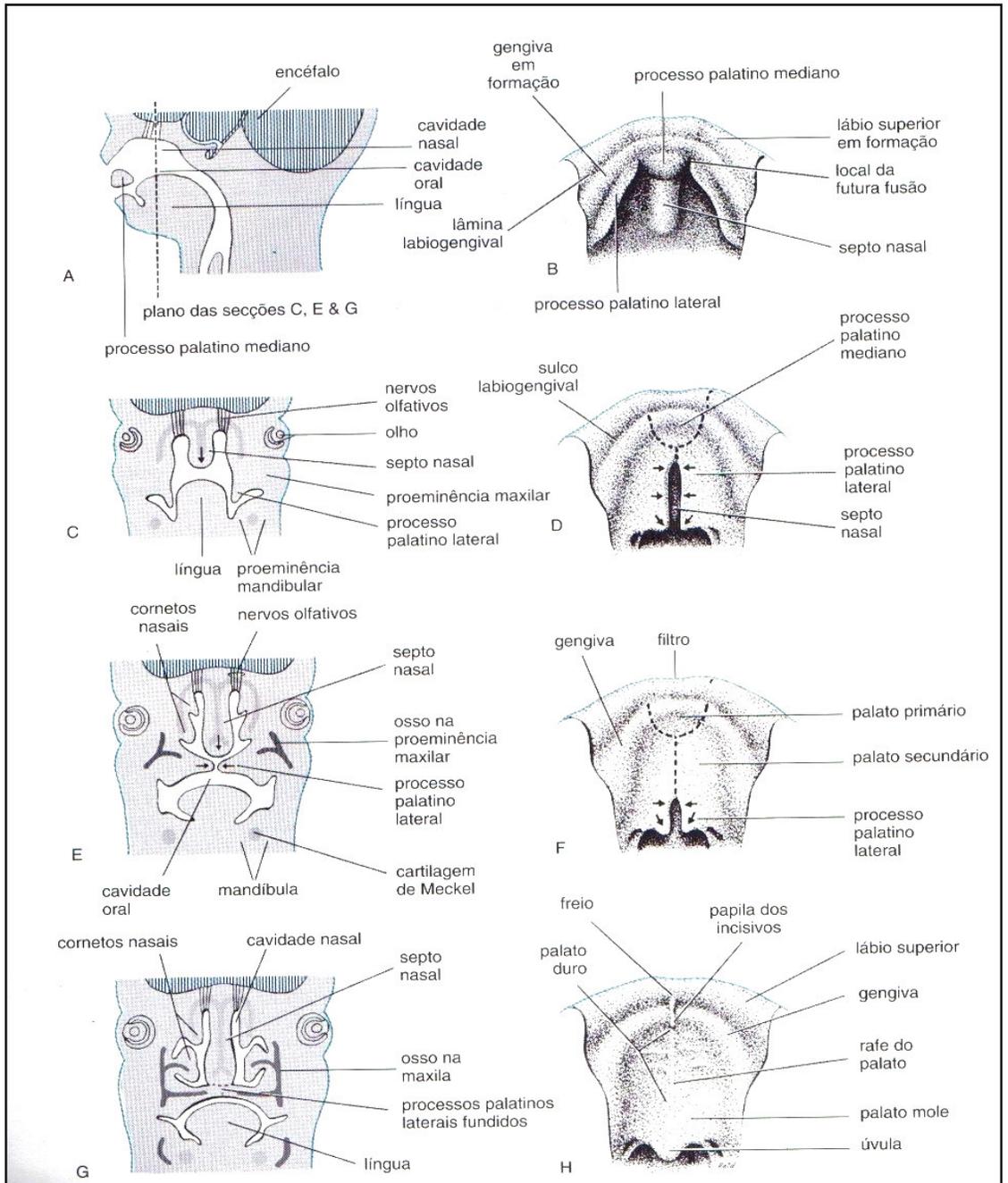


Figura 4 - Esquema representativo da palatogênese humana.
 Fonte: MOORE; PERSAUD, 2000

Um pequeno canal nasopalatino persiste na linha média do palato, entre a pré-maxila e os processos palatinos do maxilar, terminando no forame incisivo. Uma sutura irregular corre do forame incisivo até o processo alveolar do maxilar, indicando onde os palatos primário e secundário se fundiram e onde as fissuras palatinas anteriores ocorrem.

As fissuras do lábio superior e palato são classificadas de acordo com critérios de desenvolvimento, tendo o forame incisivo como ponto de referência.

As malformações labiais incluem fissura labial com ou sem fissura da porção alveolar do maxilar. Essas malformações resultam de uma deficiência do mesênquima no(s) processo(s) maxilar(es) e no segmento intermaxilar (MOORE; PERSAUD, 2000).

As fissuras labiais variam de pequenos defeitos do vermelhão labial até outras maiores, que se estendem pelo assoalho nasal, através da parte alveolar do maxilar, podendo ser uni ou bilateral. Esses defeitos decorrem da falta de união do processo maxilar, do lado afetado, às saliências nasais mediais fundidas, sendo consequência da não-fusão das massas mesenquimais e da não-proliferação do mesênquima sob o epitélio sobrejacente, resultando, então, uma fissura labial persistente. Além disso, na fissura o epitélio torna-se distendido, e ocorre um rompimento de tecidos, no assoalho da fissura persistente, levando a uma divisão do lábio em partes lateral e medial (Figura 5). Às vezes, uma ponte de tecido, denominada faixa de Simonart, une as partes da fissura labial incompleta (MOORE; PERSAUD, 2000).

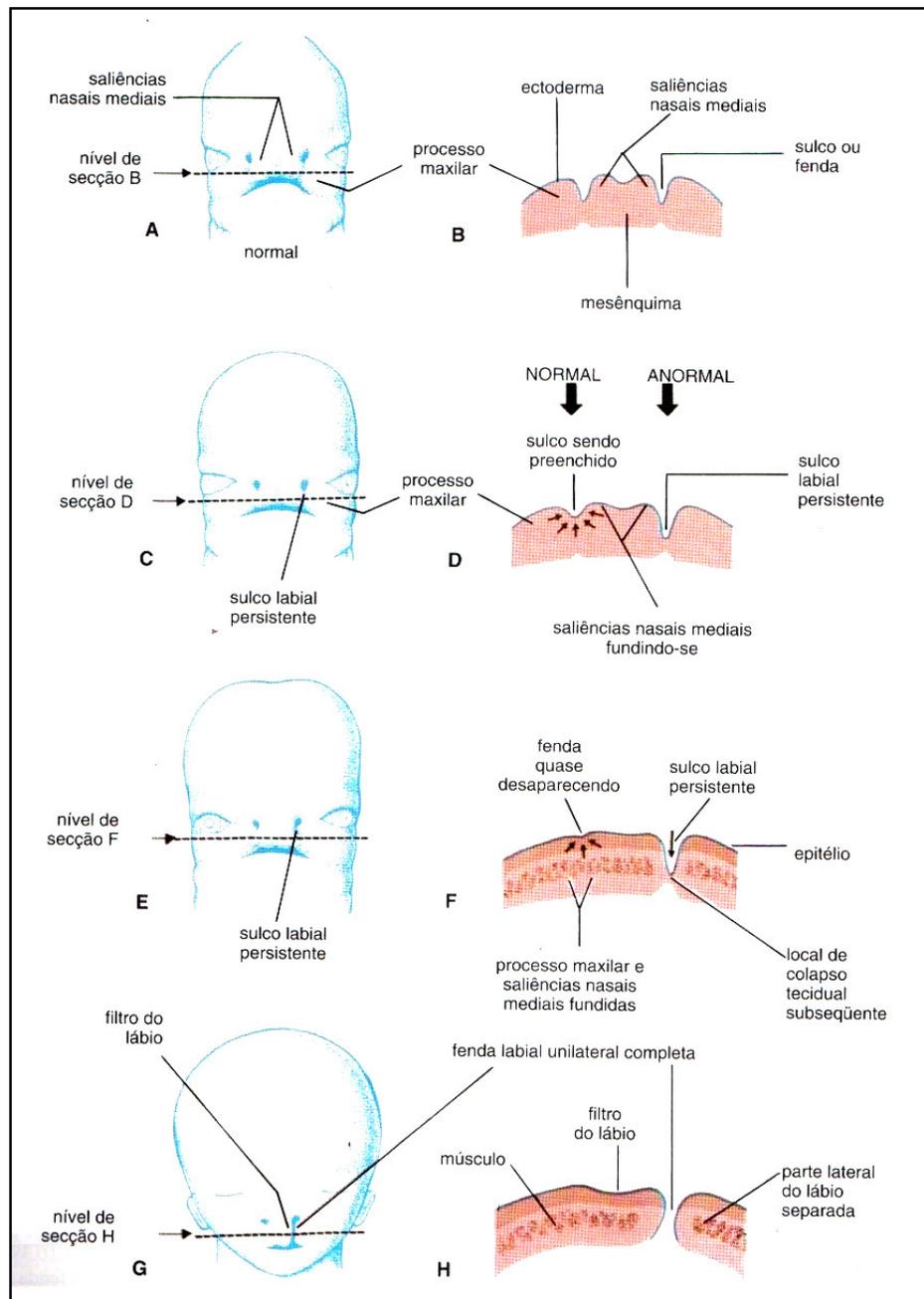


Figura 5 - Esquema representativo da formação de fissura labial unilateral. (A) embrião de 5 semanas; (B) secção horizontal da cabeça, ilustrando os sulcos entre os processos maxilares e a fusão dos processos nasais mediais; (C) embrião de 6 semanas com sulco labial persistente no lado esquerdo; (D) secção horizontal da cabeça, sulco sendo preenchido gradualmente do lado direito graças à proliferação do mesênquima (setas); (E) embrião de 7 semanas; (F) secção horizontal da cabeça, mostrando que o epitélio do lado direito foi quase empurrado para fora do sulco entre o processo maxilar e o processo nasal medial; (G) feto de 10 semanas com fissura labial unilateral completa; (H) secção horizontal da cabeça, após a distensão do epitélio e o rompimento dos tecidos no assoalho do sulco labial persistente do lado esquerdo, formando uma fenda labial unilateral completa.

Fonte: MOORE; PERSAUD, 2000

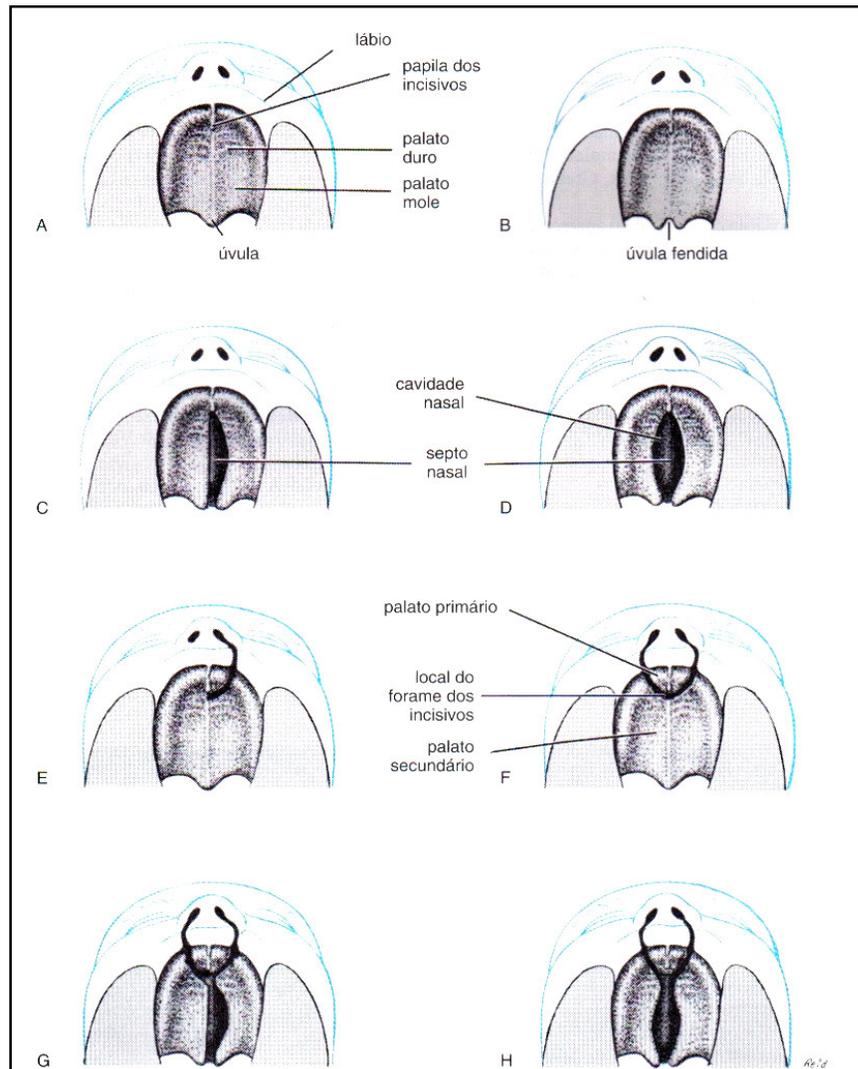


Figura 6 - Esquema representativo da formação de fissuras labiais e/ou palatinas. (A) Lábio e palato normais; (B) Fissura palatina envolvendo somente a região da úvula; (C) Fissura palatina unilateral; (D) Fissura palatina bilateral; (E) Fissura labial e de palato primário unilateral; (F) Fissura labial e de palato primário bilateral; (G) Fissura labial e de palato primário bilateral e fissura palatina unilateral; (H) Fissuras labial e de palato primário e palatina bilaterais.

Fonte: MOORE; PERSAUD, 2000

As fissuras palatinas podem envolver apenas a úvula (úvula bífida) ou podem estender-se pelas regiões mole e dura do palato (Figura 6). A base embriológica da fissura palatina é a falta de união das massas mesenquimais dos processos palatinos laterais, uma com a outra, com o septo nasal e/ou com a margem posterior do mesênquima do palato primário (MOORE; PERSAUD, 2000).

Vários fatores podem influir na malformação palatina congênita: (a) força da lâmina (quanto menor a força da lâmina na movimentação, menor velocidade e maior a probabilidade de fissura); (b) resistência da língua (quanto maior, mais chance de ocorrer a malformação); (c) largura da cabeça (quanto mais larga, maior a dificuldade de fusão palatina); (d) forma da face (os braquicéfalos têm maior chance

de possuir FLP do que os dolicocefalos, por apresentar a face mais larga); (e) alterações da cabeça e da mandíbula (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2002).

O mecanismo de desenvolvimento mostra que a fissura labial isolada ocorre de forma similar à fissura de lábio e palato, as quais diferem do mecanismo de formação das fissuras somente de palato. De acordo com a Confederação de Cirurgias Plástica, Reconstructiva e Estética e da Associação Americana de Fissuras Palatinas e Craniofaciais, a classificação para fissuras labiais e palatinas foi assim determinada: (1) fissura labial: fissuras anteriores ao forame incisivo, isto é, fissuras que ocorrem no palato primário como resultado de falha na penetração mesodérmica. Esse grupo inclui desde pequenas fissuras labiais até as que compreendem toda a pré-maxila; (2) fissura labiopalatina: fissuras que combinam dois eventos embrionários, ou seja, falha no desenvolvimento normal dos palatos primário e secundário; (3) fissura palatina: fissuras que ocorrem posteriormente ao forame incisivo, fruto de falha na fusão dos dois processos palatinos, na formação do palato secundário (HARKINS et al., 1962). As fissuras labiais e labiopalatinas normalmente são analisadas em conjunto e as fissuras palatinas, analisadas isoladamente (VIEIRA, 2006).

3.2 EPIDEMIOLOGIA DAS FLP

A frequência das FLP varia de acordo com o autor e a população estudada. Wyszinski, Beaty e Maestri (1996) encontraram uma prevalência de 3,6/1000 afetados na população de nativos norte-americanos. Já Vieira e Orioli (2001) em uma revisão de estudos epidemiológicos das FLP, de diferentes regiões da Europa e das Américas encontraram que essa frequência varia de 1/1000 a 1,89/1000. Em pacientes não-sindrômicos, há maior prevalência de fissuras labiais com ou sem envolvimento palatino (FL/P) do que fissuras palatinas isoladas (FP). Essas últimas são mais frequentes no gênero feminino, enquanto FL/P ocorrem mais no gênero masculino. O lado esquerdo é duas vezes mais afetado do que o direito e a raça negra é menos afetada do que a raça branca (VIEIRA; ORIOLI, 2001).

Segundo Beaty et al. (1997 e 2002), Marazita et al. (2002) e Jugessur et al. (2003a), há maior prevalência de casos de FL/P em pacientes do gênero masculino, enquanto as FP são mais frequentes no feminino.

No Brasil, a incidência de FLP deve ser em torno de 1/650 nascimentos vivos, embora esses dados não sejam precisos (MAZZOTINI; FREITAS; SILVA FILHO, 1999).

Loffredo, Freitas e Grigolli (2001) relatam uma prevalência de 0,88 por 1000 nascidos vivos durante o período de 1970 a 1974, em Porto Alegre. No período de janeiro de 1975 a dezembro de 1995, foram registrados, no País, 16.853 novos casos de FLP, sendo 61% deles provenientes da região Sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo), com uma prevalência estimada em 0,19 por 1000 nascidos vivos, apresentando tendência ascendente, de 0,11, 0,17, 0,23 e 0,28, respectivamente aos quinquênios de 1975 a 1980, 1980 a 1985, 1985 a 1990 e 1990 a 1995. Assim, nos últimos 20 anos, a prevalência aumentou em 2,6 vezes. Há dúvidas se tal tendência é decorrente de melhoria contínua na obtenção da informação com o aumento das notificações, ou se é devida ao aumento real do número de casos. Do total de casos de FLP registrados nos últimos 20 anos, 4.413 (26%) se referiram à FP; os outros 12.440 (74%) eram de FL/P.

Collares et al. (1995) monitoraram os nascimentos ocorridos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS no período entre 1983 e 1993. Relataram que a prevalência de FLP foi de 1/758 nascimentos. As FP foram responsáveis por 26,8% dos casos, FL por 34,1% e FL/P por 39,1%. Havia predomínio de FP em pacientes do gênero feminino e os autores acreditam que isto se deva ao fechamento mais tardio do palato no gênero feminino.

Furlaneto e Pretto (2000), em um estudo epidemiológico com 750 prontuários de pacientes fissurados do até então Serviço de Defeitos da Face da PUCRS, hoje chamado Centro de Reabilitação de Fenda Labiopalatal (CERLAP) da mesma Universidade, encontraram que a maioria dos indivíduos afetados era de eurobrasileiros (96,3%) e do gênero masculino (54,6%). As FL/P foram as mais frequentes (84,45%), seguidas pelas FP (12,90%), sendo o lado esquerdo o mais afetado. Os mesmos autores encontraram maior número de FL/P no gênero masculino e de FP no gênero feminino.

Os índios Bari da Venezuela possuem a prevalência mais alta de FL/P já relatada: 12 afetados em uma população de aproximadamente 1.200 indivíduos. Aparentemente, essas malformações estão presentes há muitas gerações nessa população. O estigma social relativo à FLP nessa população é insignificante, já que um chefe era portador de uma fissura labial. Normalmente, índios afetados casam e têm filhos, casais que têm um filho afetado não evitam concepções futuras. Entre os Bari é comum o casamento entre primos e entre pessoas com outros tipos de consangüinidade. Como esses índios formam um isolado racial, a frequência dessa malformação aumentou, provavelmente, devido ao endocruzamento. Sua população total parece nunca ter ultrapassado 2500 indivíduos. Eles permanecem endogâmicos e a maioria vive na reserva oficial, a certa distância de outros centros populacionais. Sendo assim, os Bari são um isolado racial extremamente empolgante para examinar-se a etiologia genética de FLP. Com os padrões de distribuição da anomalia entre indivíduos aparentados e o ambiente relativamente homogêneo da reserva, é improvável que um teratígeno seja responsável pela ocorrência de FLP nessa população (BALLEW; BECKERMAN; LIZARRALDE, 1993).

Entre os estudos que investigam as causas das FLP-NS existe uma grande variação no que se refere ao gênero. Para Marazita et al. (2002), 60% dos casos eram referidos em pacientes do gênero masculino e 40% no feminino. No estudo de Vieira et al. (2004), essa proporção se inverte, 64% são do gênero feminino e 36% do masculino. Já para Peanchitlertkajorn et al. (2003), os dois gêneros pareciam estar em equilíbrio, pois 51% dos casos são do masculino e 49% do feminino.

Blanco et al. (1998), estudando pacientes com FLP-NS da população chilena, encontraram 52% de recorrência familiar. Passos-Bueno et al. (2004), em análise de populações dos estados de São Paulo e do Ceará, observaram que 18,7% das famílias com FLP-NS já possuíam pelo menos mais um parente afetado. Suzuki et al. (2004), em estudo semelhante com a população vietnamita, observaram uma recorrência familiar de 4%.

Em relação ao tipo de FLP-NS, Lidral et al. (1997), analisando uma amostra da população de Iowa (EUA), encontraram que 76% dos casos eram de FL/P e 24% de FP. Para Beaty et al. (1997), na população de Maryland (EUA), 40% dos casos se referiam à FP e 60% às FL/P, sendo que, quando essas últimas eram analisadas separadamente, 15,7% eram apenas FL e 44,3% eram FLP. Para os mesmos autores em estudo na mesma população, em 2002, foram encontrados 31% dos

indivíduos com FP e 69% com FL/P (22% eram FL e 47% FLP). Suzuki et al. (2004), na população vietnamita estudada, observaram que 9% dos pacientes apresentavam FP e 91% FL/P (28% com FL e 61% com FLP).

As famílias de pacientes com FL são freqüentemente relutantes em participar de estudos sobre FLP, aumentando assim a possibilidade do viés na seleção dos pacientes. Isso possivelmente ocorre porque esses pacientes podem ser tratados, com sucesso, por um cirurgião plástico, com resultado bastante satisfatório, não requerendo tratamento e acompanhamento posterior (BEATY et al., 1997).

3.3 ETIOLOGIA DAS FLP

Em 1942, Fogh-Anderson forneceu a primeira evidência baseada em estudos populacionais de que as FLP tinham um importante componente genético (PRESCOTT et al., 2000).

Muitos grupos de pesquisa têm tentado elucidar a etiologia das FLP, com limitado sucesso (MARAZITA et al., 2002). As FLP, como muitos dos defeitos congênitos, mostram agregação familiar. Ambas as formas de fissuras bucais (FL/P e FP) estão envolvidas em mais de 300 diferentes síndromes genéticas, porém as formas sindrômicas (quando as crianças nascem com anomalias congênitas adicionais) reconhecidas representam apenas uma fração de todos os casos (de 11 a 30% das FL/P e 14 a 47% de FP). É, portanto, de considerável importância elucidar os fatores etiológicos genéticos e não-genéticos (exposição a teratógenos conhecidos) que contribuem para a forma não-sindrômica, a mais comum (FIELD et al., 2004). Sua verdadeira causa é, por definição, diferente das formas sindrômicas. Isso impõe requisitos para os estudos baseados em populações, desde exame físico até histórico familiar completo do paciente. Estudos familiares são o único caminho para completar a identificação de fatores genéticos latentes em FLP (BEATY et al., 1997; MARAZITA et al., 2002).

Uma associação estatística entre um marcador genético e um defeito congênito sugere alguma participação genética, mas não identifica automaticamente qual é o mecanismo biológico ou genético. Qualquer associação entre um marcador

genético e uma doença pode refletir: (1) um papel biológico para o produto gênico na patogênese da doença; (2) confusão entre a frequência alélica do marcador e a doença em um substrato não reconhecido da doença; (3) desequilíbrio de ligação² entre o gene marcador e o gene causador da doença. Para doenças multifatoriais, nas quais tanto fatores genéticos quanto ambientais contribuem para a patogênese da doença, a distinção entre essas alternativas, muitas vezes, não é tão simples de detectar-se (HWANG et al., 1995).

É possível usar-se famílias com um único indivíduo afetado para melhor definir o papel potencial dos fatores de risco ambientais para fissuras, enquanto famílias multiplamente afetadas podem ser mais adequadas para pesquisar-se os fatores genéticos (BEATY et al., 1997).

A existência do papel da genética e de fatores ambientais, na etiologia das FLP, tem sido extensivamente demonstrada. Estudos com genes candidatos e análise de desequilíbrio de ligação fornecem uma boa aproximação para a identificação de genes causadores de fissuras em humanos (PASSOS-BUENO et al., 2004).

Estudos de ligação³ e associação alélica⁴ não evidenciaram, até o momento, a existência de um locus específico que seja necessário para o desenvolvimento de FLP. Ao contrário, a etiologia genética das FLP parece mais complexa, havendo a participação de vários loci, nos cromossomos 2, 4, 6, 14, 17 e 19, que foram primeiramente detectados nas populações de descendência caucasóide européia (MARAZITA et al., 2002).

3.3.1 Genética

Estudos em gêmeos mostraram a importância da genética no desenvolvimento de FLP-NS, pela observação da existência de uma taxa de concordância de 25-50%

² Ocorrência conjunta de duas características com uma frequência maior do que a esperada pelo acaso, isto é, com uma frequência maior do que o produto das frequências individuais de ambas as características.

³ Genes localizados no mesmo cromossomo.

⁴ Determinados alelos, em dois ou mais loci vizinhos, demonstram associação alélica se ocorrerem juntos, em frequências significativamente diferente daquelas esperadas para frequências alélicas individuais. (Strachan T.; Read A. P., Genética Molecular Humana. 2.ed., Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. p.545)

entre monozigóticos e de 3-6% entre dizigóticos. Entretanto, sua contribuição ainda não foi claramente definida. Alguns estudos sustentam a hipótese de um gene principal com herança autossômica tanto dominante como recessiva. Outros estudos sustentam um modelo oligogênico, no qual 2 a 20 genes podem atuar. Além disso, fatores ambientais como fumo, consumo de álcool, nutrição materna e consumo de vitaminas são também cogitados como reguladores da suscetibilidade genética às FLP (MORENO et al., 2004).

Alguns autores, como Carter (1969), Melnick et al. (1986) e Chung et al. (1986), acreditavam, no entanto, na ação de um gene principal autossômico dominante ou recessivo.

Ballew, Beckerman e Lizarralde (1993) coletaram 200 amostras de sangue da população Bari da Venezuela. A pesquisa consistiu na investigação do modo de transmissão de FLP através da construção de genealogias para todos os Bari venezuelanos. A avaliação das genealogias das famílias com indivíduos afetados mostrou que, nessa população, as FLP poderiam ser transmitidas como uma característica autossômica recessiva.

Um estudo realizado na população chinesa indicou que a causa principal das FLP também poderia ser a presença de um locus autossômico recessivo (VIEIRA; ORIOLI, 2001).

De acordo com esses mesmos autores, o risco de recorrência dessas malformações, em famílias com história prévia, aumenta substancialmente quando comparado com famílias sem história de FLP, o que reforça a importância de fatores genéticos na sua etiologia. É sugerido por muitos autores que as FLP em humanos apresentam uma etiologia genético-ambiental, compatível com o modelo de herança multifatorial com efeito limiar. Nesse modelo, como ocorre com grande parte das malformações congênitas, existe um limiar que separa os indivíduos de uma amostra em dois grupos: os normais e os afetados, com uma variação na gravidade da anomalia de moderada a grave. Tal variação pode ser explicada por um limiar genotípico, que é a quantidade mínima de genes necessários para que as anomalias se manifestem num ambiente determinado. Em algumas malformações congênitas, como no caso das FLP, o limiar genotípico parece diferir entre os gêneros, sendo um deles mais suscetível, necessitando menos genes para manifestar a característica (fissura labial no gênero masculino e fissura palatina no gênero feminino) e o outro

menos suscetível, necessitando de mais genes para manifestar a característica (fissura labial no gênero feminino e fissura palatina no masculino).

Para Marazita et al. (2004), a ocorrência de uma FLP depende de um vasto número de genes, cada um com efeito igual, menor e acumulativo, além de fatores ambientais. No entanto, de acordo com os mesmos autores, testes desse modelo realizados em grandes populações foram inconclusivos. Além do mais, praticamente todos os estudos por eles realizados aceitam a hipótese de haver genes de efeito principal na determinação da malformação.

Com evidências de que a história familiar de pacientes portadores de FLP é compatível com a contribuição de um ou mais locos gênicos, vários grupos de pesquisadores estão tentando identificar esses genes (genes candidatos), usando as ferramentas de análise de ligação e de associação (MARAZITA et al., 2004).

3.3.2 Genes candidatos que atuam na etiologia das FLP

Os estudos de FLP em populações humanas têm a vantagem de que essas anomalias são facilmente reconhecíveis. Têm havido sugestões intrigantes com relação a genes específicos e fatores de risco ambientais, que podem combinar-se para dar origem a esses defeitos (BEATY et al., 1997).

Os genes candidatos são aqueles que potencialmente podem fazer parte da etiologia de um determinado distúrbio. Podem ser identificados através de estudos em modelos animais ou de tecidos em estágio embrionário específico (LIDRAL et al., 1997).

No caso das FLP, quando um gene específico mostra estar relacionado com a gênese das malformações, seu conhecimento pode ser útil na compreensão do desenvolvimento molecular de lábio e palato, normal e anormal, podendo prever, com maior precisão, os riscos de recorrência desses defeitos nos descendentes dos afetados (VIEIRA; ORIOLI, 2001).

Estudos de ligação, bem como estudos de associação, têm sido utilizados para testar genes candidatos na etiologia das FLP. Quando dois genes estão

ligados, as combinações específicas dos alelos, no locus considerado, são transmitidas juntas (PRESCOTT et al., 2000).

Muitos genes e famílias de genes podem, portanto, ser considerados como candidatos adequados para as FLP. Estudos de associação e ligação dessas malformações, bem como, deleções e translocações cromossômicas implicam na existência de muitos locus suscetíveis possíveis, mas às vezes são falhos no fornecimento de evidências conclusivas (PRESCOTT et al., 2000). Esses estudos frequentemente suscitam dificuldades de replicação.

O modelo tríade caso-genitores é uma ferramenta poderosa para se identificar associações entre variações gênicas e doenças, tendo a vantagem de não requerer controles externos (JUGESSUR, et al., 2003b; SUAZO et al., 2005). Além disso, evita preocupações sobre falsos resultados que possam contribuir para confusões nos resultados ou estratificação da população dentro da amostra, porque o caso, em observação, é sempre comparado com controles extraídos da mesma família (BEATY et al., 2002).

Vários locus ou regiões nos cromossomos 2, 4, 6, 14, 17 e 19 têm apresentado resultados positivos em estudos de ligação ou de associação em FL/P, FP ou ambas (WYSZYNSKI; BEATY; MAESTRI, 1996; GASPAR et al., 1999; CARINCI et al., 2000; MARAZITA et al., 2002). Esses resultados necessitam de confirmação, pois, nenhuma posição cromossômica foi consistentemente positiva em todos os estudos (MARAZITA et al., 2004), sugerindo a existência de heterogeneidade genética⁵. Além disso, pode haver também heterogeneidade populacional⁶ em genes predisponentes à FLP (FIELD et al., 2004).

Prescott et al. (2000) relataram os achados resultantes de uma varredura genômica de 92 pares de irmãos afetados, com o objetivo de identificar locus suscetíveis para as FLP. Embora nenhum locus tenha alcançado o nível exigido para significância estatística, duas das áreas escaneadas estavam envolvidas na etiologia das FLP: uma no cromossomo 2 (2p13, que é uma área que abrange o gene *TGFA*) e outra no cromossomo 6 (6p23-24).

⁵ Situação na qual mutações em dois ou mais locus distintos produzem o mesmo fenótipo ou fenótipos semelhantes

⁶ Genes diferentes, ou combinação de genes atuando em diferentes populações (Borges-Osório e Robinson, 2002, op. cit, p. 427)

Alguns genes, como o *TGFA*, *TGFB3*, *MSX1* e *BCL3*, têm sido testados com o objetivo de observar se fazem parte da etiologia das FLP. Assim, é importante o conhecimento da ação normal desses genes no desenvolvimento embrionário, para que possam ser estudados os efeitos de suas mutações.

Gene *TGFA*

A proteína TGFA, codificada pelo gene *TGFA* (fator transformador de crescimento alfa), é uma proteína secretora que se liga ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) que está localizado no epitélio palatino durante o fechamento do palato (JUGESSUR et al., 2003a; PASSOS-BUENO et al., 2004). A proteína TGFA pode funcionar como uma versão embrionária normal do fator de crescimento EGF-relacionado. A proteína TGFA é considerada um potente mitógeno epitelial, baseado em observações nas quais hiperplasias epiteliais eram vistas em pesquisas de tecidos transgênicos de ratos com produção excessiva de TGFA (SANDGREN et al., 1990 *apud* TANABE et al., 2000). O gene *TGFA*, agindo sinergicamente com a proteína TGFB (fator transformador de crescimento beta), promove proliferação celular *in vitro* (VIEIRA; ORIOLI, 2001).

O gene *TGFA* se expressa durante o desenvolvimento craniofacial. Ratos com deficiência da proteína TGFA mostraram anomalias oculares e pêlos anormais, mas não anomalias dentárias (SATOKATA; MASS, 1994; MACHIDA et al., 1999). O *TGFA* então foi selecionado como um gene candidato funcional para as FLP (SATOKATA; MASS, 1994).

O gene *TGFA* tem de 70 a 100 quilobases (kb)⁷, localiza-se no braço curto do cromossomo 2 (2p13) e codifica um polipeptídeo formado por 50 aminoácidos. (VIEIRA; ORIOLI, 2001). A figura 7B mostra a localização cromossômica do gene referido.

Ardinger et al. (1989) foram os primeiros a relatar associação entre alelos raros do *TGFA* em um estudo de caso-controle. Esses achados foram subsequêntemente confirmados, principalmente em populações caucasóides, por meio de análise de associação e ligação.

⁷ Quilobase (kb) – mil pares de bases de DNA

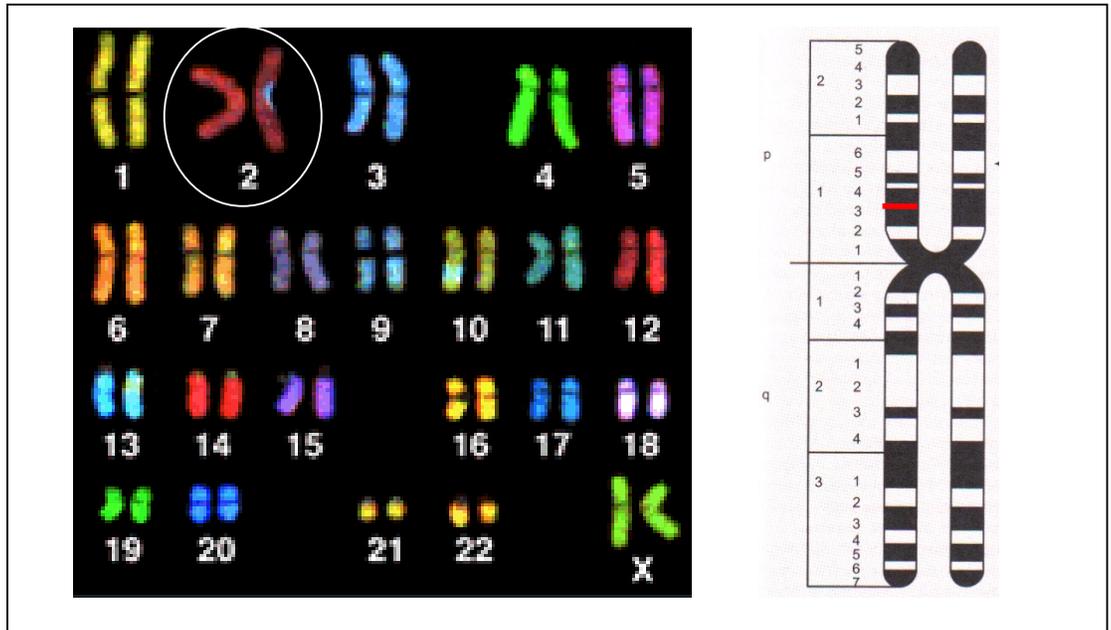


Figura 7 – (A) Cariótipo de um indivíduo do gênero feminino (XX), obtido com hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), mostrando no detalhe o cromossomo 2. (B) Cromossomo 2 com a localização do gene *TGFA* (2p13) (vermelho).

Fonte: www.accessexcellence.org/AB/GG/sky.html ; BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, (2002)

O gene *TGFA* constitui um polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), apresentando a deleção de uma seqüência de quatro bases (TAAT) no alelo mutante, quando é usada a enzima de restrição *Taq I*. Neste caso mostra um alelo *C1* com 178pb e outro *C2* com 174pb (TANABE et al., 2000). O polimorfismo *TGFA/Taq I* está localizado no íntron 5 e possui 602 pb no sentido 5' do sitio acceptor do éxon 6 (VIEIRA, 2006). A associação entre FLP e o polimorfismo *Taq I* no lócus *TGFA* foi encontrada em algumas populações, mas não em outras, o que pode ser devido a vieses nas avaliações caso-controle das populações (VIEIRA; ORIOLI, 2001).

Quando o gene *TGFA* é analisado com a enzima de restrição *Bam HI* mostra o alelo *A1* com 7,0 kb e outro alelo *A2* com 4,0 kb. Essa associação foi menos estudada, sendo que algumas pesquisas não mostraram evidências de associação positiva em caucasóides; porém um estudo realizado no Chile, por JARA et al., (1995), mostrou um aumento de 9,3 vezes no risco de ocorrência de FLP em indivíduos homocigotos *A2A2*, quando comparados com aqueles de genótipos *A1A1* ou *A1A2*.

Vários estudos em populações caucasóides têm mostrado associação entre o marcador polimórfico *Taq I*, no lócus *TGFA*, e FLP. Embora vários estudos

publicados mostrem uma associação positiva entre ambos, o mecanismo biológico que explica essa associação não está claro, uma vez que o marcador *Taq I* forma um alelo polimórfico situado em uma região inexpressiva do gene, o íntron (BEATY et al., 1997).

Ardinger et al. (1989) demonstraram uma associação significativa entre alelos raros de *Taq I* (C2) e *BamH I* (A2) do locus *TGFA* em uma população caucasóide de Iowa (EUA). Esses achados têm sido subseqüentemente confirmados em outras populações caucasóides, embora a associação seja apenas encontrada com o polimorfismo *Taq I* (CHENEVIX-TRENNCH et al., 1991; HOLDER et al., 1992). Uma metanálise combinando todos os dados publicados até 1996 demonstrou uma associação significativa entre *TGFA* e FLP, com a existência de uma heterogeneidade de freqüências de alelos C2 e A2 nos indivíduos afetados em ambos os polimorfismos estudados (MITCHELL, 1997).

Em pesquisa realizada na população Bari (BALLEW; BECKERMAN; LIZARRALDE, 1993) foram estudados indivíduos afetados e seus parentes em primeiro grau (irmãos, genitores e filhos) quanto ao polimorfismo *TGFA*, não se encontrando resultado estatístico significativo.

Shiang et al. (1993) usando comparação caso-controle, nas quais os controles eram indivíduos sem qualquer malformação congênita, mostraram associação entre *TGFA* e FP em populações caucasóides; Shaw et al. (1998) encontraram resultados na mesma direção, porém sem significância estatística, e o trabalho de Stoll et al. (1993) não mostrou desequilíbrio de ligação. É difícil fazer uma comparação entre os diversos estudos porque são usados marcadores e amostras populacionais diferentes.

Hwang et al. (1995) utilizaram 183 pacientes com FLP-NS nascidos em Maryland entre 1984 e 1992. Sessenta e nove foram diagnosticados com FP e 114 como FL/P. Os controles consistiram em 284 crianças com defeitos isolados, que não FLP. Foram estudados apenas pacientes caucasóides. Os casos de FP e FL/P foram analisados separadamente, mas ambos os grupos foram comparados ao mesmo grupo controle. A freqüência do alelo C2 no polimorfismo *TGFA/Taq I* foi significativamente maior entre os pacientes com FP ($p < 0,05$). Entretanto, os pacientes com FL/P e seus controles apresentaram freqüências idênticas para o alelo C2 ($p > 0,05$).

Beaty et al. (1997) analisando um grupo de pacientes caucasóides portadores de FLP-NS, testaram a associação da anomalia com o genótipo *TGFA/Taq I*. O alelo C2 apresentou frequência mais baixa nos controles, do que nos afetados (4,6% : 6,9% respectivamente). Esta diferença não foi estatisticamente significativa, não sustentando, portanto, a hipótese de associação entre o marcador genético e as FLP.

Lidral et al. (1998), utilizando a população de Iowa, que é 95% caucasóide, não encontraram associação significativa entre o locus *TGFA* e FLP. Compararam esses resultados com os de Shiang et al. (1993) e Ardinger et al. (1989), que haviam encontrado associação entre *TGFA* e FLP. Os autores consideram que essa diferença de resultados possa ser devida ao tipo de controles utilizados por esses últimos autores. O controle usado por Ardinger et al. (1989) era constituído por funcionários de laboratórios, placentas e indivíduos com outras doenças, em contraste com o utilizado por Lidral et al. (1998), que era formado por uma população controle homogênea.

Christensen et al. (1999) encontraram uma frequência consideravelmente mais alta do alelo C2 do *TGFA* em pacientes dinamarqueses comparados com pacientes dos Estados Unidos, Grã-Bretanha, Austrália e França. Mesmo assim, a distribuição do genótipo *TGFA* era praticamente idêntica nos casos de FL/P, FP e controles. Vinte e cinco por cento das crianças apresentavam um alelo C2 do *TGFA*.

Embora estudos de ligação sugiram que o *TGFA* não seja um gene principal, testes de transmissão⁸, bem como de desequilíbrio de ligação e estudos de interações gene-ambiente sustentam a hipótese de ser o *TGFA* um gene modificador das FLP (PRESCOTT et al., 2000, SUAZO et al., 2005).

Tanabe et al. (2000) realizaram um estudo em pacientes japoneses, no qual os probandos tinham FL/P ou apenas FP. Na amostra analisada, constituída de 28 probandos e 73 controles, não foi observada diferença significativa em relação à presença do alelo mutante (C2), já que nos dois grupos a presença do alelo selvagem (C1) predominou ($p > 0,05$). Foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando analisada a variação alélica *TGFA/K-primer* (3' – região não codificada do mRNA do *TGFA*), usando enzimas de restrição *Nco I* e *Hinf I* e seqüenciamento direto. Dos quatro alelos encontrados na utilização do K-primer,

⁸ Teste de desequilíbrio de transmissão – é um teste estatístico de associação alélica (Strachan; Read, 2002, op. cit., p. 555)

observaram que a presença do alelo 4 é mais freqüente nos pacientes com FL/P, mostrando uma diferença altamente significativa entre casos e controles ($p < 0,05$).

O estudo de Marazita et al. (2002) incluiu 671 indivíduos de 60 famílias com dois ou mais membros afetados por FLP, totalizando 145 indivíduos afetados. Nenhum dos marcadores estudados, incluindo o *TGFA*, mostrou associação positiva com FLP.

Passos-Bueno et al. (2004) examinaram a variante C2 do polimorfismo *TGFA/Taq I* em 536 pacientes com FLP-NS e 412 controles. Os probandos e controles correspondentes foram avaliados em diferentes centros do Brasil, como parte representativa da mistura étnica de nossa população. Os dados sugerem que o *TGFA* não é um locus modificador relevante para a incidência de FL/P nas regiões sudeste e nordeste brasileiras. De acordo com os autores, a população brasileira apresenta uma mistura étnica triétnica de eurobrasileiros, afro-brasileiros, e ameríndios, o que torna muito difícil relacionar perfeitamente a etnia de casos e controles. Então, os autores especulam que alguns efeitos de estratificação populacional poderiam causar a ausência de significação estatística do estudo de caso-controle em relação ao polimorfismo *TGFA/Taq I*. A discreta diferença na freqüência do alelo C2 observada entre as duas amostras de controle parece não ser suficiente para levar em conta tal efeito.

Marrero et al. (2005) analisaram 119 indivíduos classificados como caucasóides e moradores de diferentes localidades do estado do Rio Grande do Sul. Nesses indivíduos foram testados genes que conhecidamente são provenientes de populações européias: alguns no DNA mitocondrial (mtDNA), e outros sete polimorfismos do cromossomo Y. Numa população específica, de Veranópolis, uma cidade caracterizada pela grande influência da colonização italiana no século XIX, os resultados mostraram uma quase completa ancestralidade européia. Entretanto, em uma outra parte da amostra parece estar presente uma significativa fração de outras descendências: indígena (36%) e africana (16%) em relação ao estudo do mtDNA. Esse estudo indica que a população do Rio Grande do Sul é heterogênea: enquanto alguns apresentam a maior parte do seu genoma proveniente da Europa com a correspondência de seus fenótipos e ancestralidades, outros refletem a história de extensiva miscigenação com dissociação entre a aparência física e a ancestralidade.

Schultz et al. (2004) reuniram 36 famílias Filipinas multiplex⁹ em um total de 1.066 indivíduos: 198 com FLP e 868 normais. Foram genotipados 126 indivíduos afetados e 218 normais. Foi encontrado um valor significativo para o marcador *TGFA* ($p < 0,05$). Quando foram genotipados mais 149 indivíduos afetados de outras 70 famílias da mesma população os resultados encontrados (em relação ao mesmo marcador) não foram significativos, possivelmente, segundo os autores, devido à heterogeneidade genética da malformação ou a outros fatores não especificados.

Field et al. (2004) analisaram uma amostra de 38 famílias multiplex de West Bengal/Índia (14 famílias com somente FL; 4 com FL/P e 20 outras famílias com pacientes com FL ou FL/P) averiguadas através de probandos com FLP-NS. Dessas famílias, 4 eram nucleares (formadas por pai, mãe e filhos) e 34 estendidas (com três gerações ou mais) (Figura 8). Os autores procuraram preferencialmente famílias multiplamente afetadas para maximizar a probabilidade de detectar genes principais envolvidos na etiologia das FLP. O marcador *TGFA* não mostrou evidência de associação em relação às FLP, mas mostrou evidência de um modelo de herança dominante.

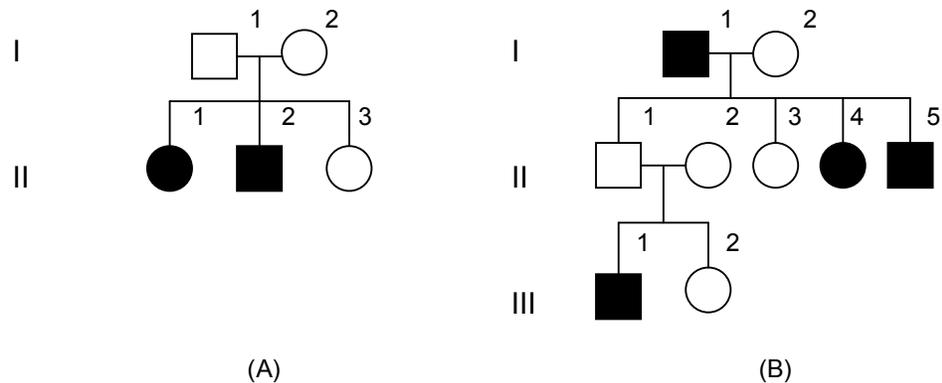


Figura 8 – Genealogias hipotéticas de famílias: (A) nuclear e (B) estendida.

Legenda: □ Homem normal ○ Mulher normal
 ■ Homem afetado ● Mulher afetada

I - III = Gerações

1 - 5 = Indivíduos de cada geração

⁹ Famílias com dois ou mais indivíduos portando a característica

Moreno et al. (2004) estudaram 49 famílias multiplex não-sindrômicas, da Clínica Noel em Medellín, Colômbia e 8 famílias também multiplex não-sindrômicas do Children's Hospital em Columbus, Ohio/EUA. Foram avaliados 123 indivíduos afetados e 198 normais da amostragem da Colômbia, e 26 afetados e 39 normais de Ohio/EUA, incluindo, quando possível, todos os parentes relacionados aos indivíduos afetados. As famílias colombianas não mostraram resultados significantes para o *TGFA*, enquanto as famílias de Ohio /EUA, sim ($p < 0,005$). De acordo com os autores, as diferenças encontradas entre as duas populações estudadas sugerem a existência de heterogeneidade populacional para o locus específico.

Marazita et al. (2004) identificaram 18 indivíduos com FLP de famílias caucasóides, em Ancara, na Turquia, filhos de pais consangüíneos. Os autores encontraram que o marcador D2S1777, localizado no cromossomo 2 (2p11.1), muito próximo do 2p13 (*TGFA*), está fortemente envolvido na etiologia das FL/P na população turca ($p < 0.05$). Um modelo autossômico recessivo foi suposto para explicar a hereditariedade de FL/P nessa população.

Suzuki et al. (2004), em estudo familiar da população do Vietnã, analisando o gene *TGFA* por seqüenciamento, não encontrou significância estatística entre o polimorfismo *TGFA/Taq I* e as FLP-NS.

Suazo et al. (2005), analisando 58 trios de pacientes de FLP-NS e genitores da população chilena, encontraram que dos dois marcadores usados para o gene *TGFA* somente um deles (D2S443) apresentou desequilíbrio de ligação com a malformação ($p < 0,005$); sendo assim, não consideraram o gene como o causador da anomalia, mas acreditam ter ele um efeito modificador na embriogênese de lábio e palato.

Outros genes candidatos

Além do *TGFA*, outros locus em várias regiões cromossômicas têm mostrado associação positiva com as FLP. Entre eles o gene *TGFB3*, que é o predecessor do fator de crescimento beta em humanos, sendo um dos três fatores transformadores de crescimento beta. O polipeptídeo que ele codifica age de forma hormonal no controle da proliferação e diferenciação de vários tipos de células. O gene está localizado no braço longo do cromossomo 14 (14q24). A sua função essencial é

atuar na morfogênese normal de palato e pulmões através de interações entre o epitélio e o mesênquima (VIEIRA; ORIOLI, 2001).

Em ratos, quando a expressão do gene *TGFB3* é inibida, há o desenvolvimento de fissura palatina bilateral; o mecanismo pelo qual o gene atua altera a fusão correta e específica do palato (JUGESSUR et al., 2003a).

O gene *MSX1* é um gene do grupo homeobox (homeobox 7 ou *HOX7*). Mutações em genes homeóticos¹⁰ (genes do grupo homeobox) resultam em anomalias estruturais importantes. Eles contêm uma seqüência de 180 pares de bases, denominada de homeobox, que parece característica dos genes envolvidos no controle e desenvolvimento do padrão espacial em geral. As proteínas determinadas por genes que contêm tal seqüência (também denominada de *HOX*) são, portanto, fatores de transcrição que especificam o destino da célula e estabelecem um eixo regional (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2002).

A maioria das mutações *HOX* é tão grave que o embrião não sobrevive. Mas, pode ser que exista um alto grau de homologia entre os genes *HOX* em diferentes grupamentos que pode causar uma redundância funcional, ou seja, um gene *HOX* pode compensar uma mutação com perda de função em outro, e então, fenotipicamente não haverá alteração (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2002).

O gene *MSX1* manifesta-se durante o desenvolvimento craniofacial e cardíaco, bem como no desenvolvimento dos membros em ratos e galinhas; são essas regiões que mostram defeitos nos pacientes com deleção no cromossomo 4 (4p16.3) (VIEIRA; ORIOLI, 2001).

Análises do seqüenciamento de *MSX1* mostram uma mutação, codificadora de um polipeptídeo que apresenta uma substituição do aminoácido arginina (na posição 31) por uma prolina. Essa mutação afetaria as interações de *MSX1* no desenvolvimento dentário normal, já que indivíduos com alelos mutantes apresentam agenesias dentárias (VIEIRA; ORIOLI, 2001).

O *BCL3* (célula B para leucemia/linfoma-3) é um proto-oncogene, localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13), que codifica um fator de transcrição envolvido no ciclo de regulação celular, tendo sido considerado como um gene candidato à formação de FLP. Estudos de ligação sugerem que ele assume padrão

¹⁰ São genes do desenvolvimento em drosófilas, que pode substituir uma parte do corpo por outra por meio de mutação (Passarge E. Genética texto e atlas. Porto Alegre: Artemed Editora, 2004. p.430)

de herança autossômico dominante, com penetrância reduzida, na etiologia de FLP (GASPAR, et al., 2002).

O gene *MTHFR* (5,10-metilenotetrahidrofolato redutase), localizado no cromossomo 6, é responsável pela absorção do ácido fólico. Mutantes desse gene (C677T – transição de uma citosina por uma timina na posição 677) foram estudados na população brasileira por Gaspar et al. em 1999. Os autores compararam 77 pacientes caucasóides com FLP e suas mães com um grupo controle de 90 mães saudáveis e seus respectivos filhos com doenças neuromusculares. Não encontraram diferença alguma significativa entre os dois grupos em relação ao polimorfismo C677T.

O gene *IRF6* (fator regulador do interferon-6) regula a expressão dos interferons alfa e beta, depois de uma infecção viral. O Interferon é uma proteína naturalmente produzida pelo organismo para combater os vírus, através do fortalecimento do sistema imunológico e regulação de outras funções pertinentes às células. A mutação nesse gene foi descoberta a partir do seqüenciamento genético em um par de gêmeos monozigóticos, sendo apenas um deles portador de FLP. Como somente um dos gêmeos era afetado, provavelmente a mutação ocorreu só na criança doente. Foi feito o seqüenciamento de 15 genes candidatos, em ambas as crianças, em regiões previamente suspeitas. A análise do genoma dos dois co-gêmeos revelou uma deleção de 18 pares de bases no gene *IRF6* do co-gêmeo afetado. Esse gene codifica uma proteína reguladora que se expressa na face durante o período embrionário. Uma vez descoberta essa mutação gênica, os pesquisadores buscaram a confirmação do achado a partir da leitura da mesma seqüência genética em 120 pacientes com a síndrome Van der Woude. A partir daí, a equipe de pesquisadores identificou e caracterizou, em ratos, a proteína codificada pelo gene *IRF6*, o qual se localiza no cromossomo 1 (1q32-41), em humanos. A mutação faz com que o processo de crescimento da região dos lábios e do palato não se complete, gerando a malformação. O gene *IRF6* está envolvido no desenvolvimento facial e uma mutação nesse locus é responsável pelo desenvolvimento da síndrome Van der Woude e do pterígio poplíteo. Os pacientes com síndrome Van der Woude apresentam fissura labial, com ou sem fissura palatina, apresentando herança autossômica dominante com penetrância incompleta (KONDO et al., 2002).

A síndrome Van der Woude é um bom modelo mendeliano de FLP-NS. É um distúrbio autossômico dominante caracterizado por depressões no lábio inferior, FLP e ocasionalmente hipodontia. Essa síndrome não possui outras anomalias craniofaciais e tampouco retardo mental (SCHUTTE; MURRAY, 1999; STAINER; MOORE, 2004).

Zucchero et al. (2004) identificaram o gene que codifica o fator regulador do interferon (*IRF6*) como um dos genes cujos mutantes são candidatos a atuarem no desenvolvimento das FLP com base em seu envolvimento na síndrome Van der Woude. Os autores relataram que o polimorfismo V274I resulta na substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 274 da proteína.

Field et al. (2004) analisaram marcadores em sete loci candidatos que tiveram resultados positivos em estudos anteriores de FLP (*TGFA*, *MSX1*, *D4S175*, *F13A1*, *TGFB3*, *RARA* e *APOC2*). Além disso, usaram marcadores de varredura em intervalos de 12,6 cM¹¹ para pesquisar outras regiões que pudessem estar envolvidas em FLP-NS em famílias bengalesas. Como resultado desta varredura genômica, os autores sugerem que várias regiões podem conter genes predispondo às FLP-NS nos cromossomos: 7 (7p15), 5 (5q11), 15 (15q26) e 20 (20q13), sendo a mais significativa encontrada no cromossomo 5 (5q11).

Estudos de loci candidatos, situados nos cromossomos 2, 4, 6, 14, 17 e 19, mostraram resultados positivos de ligação ou associação em pacientes com FLP. No entanto, nenhum desses achados tem sido consistentemente positivo em todos os estudos (MARAZITA et al., 2004).

Resultados positivos foram encontrados nos cromossomos 2, 4, 6, 10, 12, 16, e 18 nos estudos de Marazita et al. (2002 e 2004) e Prescott et al. (2000) porém os resultados positivos em cada cromossomo não foram, em geral, nos mesmos loci. Esse fato reforça a possibilidade de que possam existir loci suscetíveis às FLP em cada um desses cromossomos e que o padrão de herança seja consistente com o modelo oligogênico, no qual poucos genes são os responsáveis pela malformação (MARAZITA et al., 2004).

Schultz et al. (2004) compararam o estudo por eles realizado na população filipina, com outros em populações distintas: européia (PRESCOTT et al., 2000),

¹¹ cM: centimórgan – unidade de comprimento em um mapa de ligação. Corresponde à frequência de recombinação entre dois loci gênicos considerados de um mesmo cromossomo. Um centimórgan corresponde à frequência de 1% de recombinação entre os genes em questão.

colombiana (MORENO et al., 2004) e chinesa (MARAZITA et al., 2002). Várias regiões tiveram resultados positivos em mais de um estudo, porém somente as regiões dos cromossomos 16 (16q22) e 2 (2p13/*TGFA*) tiveram resultados positivos nos quatro estudos. Efeitos genéticos diferentes talvez estejam contribuindo para o desenvolvimento de FLP nessas populações. Concluindo, os autores sugerem investigações adicionais em locos dos cromossomos 1 (1p36), 2 (2p13), 4 (4p16), 6 (6p23), 16 (16q22) e 21 (21q22) em relação às FLP-NS. Todas essas regiões, segundo eles, contêm possíveis genes candidatos e tiveram ligações positivas e/ou associações encontradas em pelo menos dois dos estudos.

3.4 PREDISPOSTOS AMBIENTAIS ÀS FLP

Vários efeitos ambientais foram propostos como teratógenos desencadeantes de FLP. O risco ambiental mais bem documentado foi uso materno de drogas anti-epiléticas no primeiro trimestre gestacional, porém elas influenciam apenas uma pequena porção dessas malformações. Entre as exposições maternas mais comuns, relacionadas aos fatores de risco para FLP, no feto são: álcool, fumo, déficit vitamínico (ácido fólico), ou intoxicações vitamínicas (vitamina A), porém estudos relacionados à ação dessas exposições têm mostrado resultados inconsistentes. O fumo tem atraído especial atenção por ser uma exposição muito comum (FURLANETO et al., 1999).

Estudos de caso-controle foram usados para a associação entre FLP e exposição a teratógenos. Esses estudos mostraram que exposições ambientais, principalmente ao fumo materno, nos três primeiros meses de gestação, em associação com mutações no gene *MSX1*, podem influir no risco de uma criança nascer com a malformação (BEATY, et al., 2002).

Wyszynski et al. (1997), fazendo uma metanálise de 11 estudos sobre FLP, sugerem que o hábito de fumar da mãe, durante o primeiro trimestre de gestação, está associado ao aumento de risco de uma criança nascer com essas malformações.

Há evidências de que crianças expostas ao tabaco durante a gestação e portadoras do gene mutante para *TGFA* tenham um maior risco de desenvolver FLP (HWANG et al., 1995; WYSZYNSKI; BEATY; MAESTRI, 1996; SHAW et al., 1998). Entretanto, Zieger, Beaty e Liang (2005) relatam que o fumo materno associado a mutações no gene *TGFA* (*Taq I*) aumenta o risco de desenvolvimento apenas das FP, embora Jugessur et al. (2003b), considerem discreto esse acréscimo.

Baseado em um estudo de caso-controle dinamarquês de FLP, Christensen et al. (1999) investigaram os efeitos do fumo e os alelos de *TGFA* em uma amostra etnicamente homogênea. A análise revelou uma associação moderada do fumo com o risco de ocorrência dessas malformações. Não foi observada associação alguma entre o fumo e FP. O genótipo *TGFA* não foi associado com FL/P nem FP, e não foi observado qualquer efeito sinérgico com o fumo.

Hwang et al. (1995) encontraram uma interação estatisticamente significativa entre o fumo materno e o genótipo C2 do polimorfismo *TGFA/Taq I* infantil, para a FP. Interação similar foi encontrada para FL/P em um estudo californiano relatado por Shaw et al. (1998).

Mitchell et al. (2001) realizaram um estudo de caso-controle de FLP na Dinamarca, durante três anos, com o objetivo de obter informações sobre a exposição materna a teratógenos, no primeiro trimestre gestacional, através de entrevistas e de registros de nascimentos. Mulheres que deram à luz crianças nativas com FLP sem outra malformação ou síndrome foram selecionadas como mães-caso. Crianças (caso e controle) com outras malformações, além de FLP, não foram incluídas no estudo. Os autores não evidenciaram influência do fumo e do álcool nas FLP, na análise envolvendo os genes *MSX1* e *TGFB3*.

A deficiência nutricional de ácido fólico durante o desenvolvimento embrionário tem sido proposta como um fator ambiental importante na etiologia das FLP, porém vários estudos mostraram resultados inconsistentes. Gaspar et al. (2004) acreditam na hipótese de que variações genéticas nas enzimas que controlam o metabolismo do folato possam ser responsáveis, também, pela suscetibilidade às FLP.

De acordo com esses autores, é possível que o efeito de alguns genes predisponentes somente sejam observados, quando analisados em conjunto com outros loci ou com fatores ambientais. O genótipo materno pode ser considerado

como um fator ambiental, cujo aumento ou diminuição de substâncias poderia atuar no desenvolvimento embrionário. Levando isso em consideração, a análise do efeito dos genes maternos é de particular interesse, especialmente aqueles relacionados com o metabolismo de nutrientes essenciais, que podem ter importante papel durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, diminuindo a capacidade de proliferação ou migração das células durante a embriogênese.

Foi demonstrado por Shaw et al. (1999) que a administração periconcepcional materna de multivitaminas contendo ácido fólico está associada a uma redução no risco de nascimento de crianças com FLP. Os mesmos autores, em 1998, pesquisaram a relação potencial existente entre o genótipo C2 do polimorfismo *TGFA/Taq I*, o uso materno de multivitaminas e o risco de FLP. Para investigar o efeito dessa potencial interação gene-nutriente, realizaram um amplo estudo de caso-controle baseado em uma população de recém-nascidos afetados da Califórnia/EUA. Os resultados sugeriram que crianças com genótipo C2 para o polimorfismo *TGFA/Taq I*, cujas mães não ingeriram, periconcepcionalmente multivitaminas contendo ácido fólico, apresentavam um risco elevado de nascerem com anomalias como FLP. Esse foi o primeiro estudo a explorar as influências das interações gene-nutriente no risco de FLP.

3.5 ACONSELHAMENTO GENÉTICO E TERAPIA GÊNICA

É importante para o cirurgião-dentista compreender os aspectos do desenvolvimento embrionário e as possíveis causas de um desenvolvimento anormal que levam a malformações de lábio e/ou palato. É comum, entre os pais de pacientes afetados, a preocupação com a causa do defeito e por que ele ocorreu com o seu filho. Além disso, é importante o profissional poder avaliar os riscos de o mesmo evento ocorrer novamente nessa família (VIEIRA, ORIOLI, 2001).

Indivíduos com história de FLP ou qualquer outra doença grave (principalmente se ela tiver algum componente hereditário) necessitam de aconselhamento para programar suas vidas reprodutivas. O conjunto de procedimentos que visa informar e

orientar esses indivíduos é o que se chama de aconselhamento genético (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2002).

Faz parte desses procedimentos o estabelecimento do diagnóstico, etiologia, prognóstico e risco de repetição da doença na família, bem como o fornecimento de esclarecimentos que possibilitem aos casais de risco tomar decisões sobre seu futuro reprodutivo (FURLANETO; ROBINSON; BORGES-OSÓRIO, 2003).

Para fornecer um aconselhamento genético preciso é necessário o correto diagnóstico da doença em questão. É essencial o exame físico do paciente afetado, solicitar análise laboratorial apropriada, quando necessária, e obter todas as informações médicas relevantes. O exame de um paciente portador de FLP deve ser realizado com especial atenção para se detectar anomalias associadas, pois a presença das mesmas pode servir como indício de se tratar de uma síndrome da qual a fissura é apenas uma de suas manifestações e, portanto, não se tratar apenas de um caso de FLP-NS (FURLANETO; ROBINSON; BORGES-OSÓRIO, 2003).

Segundo Lie et al. (1994) *apud* Wyszynski, Beaty e Maestri (1996), o risco de uma família vir a conceber uma segunda criança com o mesmo tipo de fissura da primeira é de 31,4% para FL/P e de 44,5% para FP.

3.6 COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE DNA ATRAVÉS DE SANGUE PERIFÉRICO E SWAB BUCAL

A extração de DNA de leucócitos periféricos é o meio de obtenção de DNA mais amplamente utilizado. Entretanto, a coleta de células a partir de *swab* bucal, geralmente utilizada em medicina forense, é útil para a obtenção de amostras de DNA de recém-nascidos, crianças e pacientes que vivem em locais onde a coleta e o envio da amostra de sangue não são factíveis. O objetivo do estudo de Abrão et al., (2005) foi padronizar a técnica de extração de DNA a partir de *swab* de células de mucosa bucal utilizando NaCl, comparando-a com a extração pelo *kit* comercial.

Para testar a qualidade do DNA, os autores amplificaram três polimorfismos relacionados com hipopituitarismo hipofisário em 12 pacientes com a doença, usando DNA extraído simultaneamente de células da mucosa bucal e de sangue periférico. Ambos os métodos resultaram em DNA de boa qualidade, permitindo o estudo molecular. O método por NaCl mostrou-se mais rápido e mais barato, produzindo maior quantidade de DNA, quando comparado ao *kit* comercial e indicando ser essa uma forma confiável de obtenção de DNA para estudos genéticos.

Dos trabalhos aqui averiguados, a maioria utilizou sangue periférico como forma de obtenção de DNA (BALLEW; BECKERMAN; LIZARRALDE, 1993; HWANG et al., 1995; LIDRAL et al., 1997; BARBER et al., 1998; BLANCO et al., 1998 e 2001; SHAW et al., 1998 e 1999; TOLAROVA et al., 1998; CHRISTENSEN et al., 1999; EVERET et al., 1999; PRESCOTT et al., 2000; TANABE et al., 2000; 2001; MITCHEL et al., 2001, CARRENO et al., 2002; MARAZITA et al., 2002 e 2004; PEANCHITLERTKAJORN et al., 2003; FIELD et al., 2004; MORENO et al., 2004; SCHULTZ et al., 2004; SUZUKI et al., 2004). Ardinger et al. (1989) usaram, ainda, material placentário.

Vieira et al. (2004) adotaram somente a técnica de obtenção de DNA a partir de *swab* bucal. Já Wyszynski et al. (1997), Beaty et al. (1997 e 2002), Lidral et al. (1998), Jugessur et al. (2003a e b), Gaspar et al. (2004) e Passos-Bueno et al. (2004) realizaram as duas técnicas.

Em todos esses trabalhos a genotipagem foi realizada com sucesso, não importando se a extração de DNA tenha sido feita através de sangue periférico ou *swab* bucal. Apenas na pesquisa de Ballew, Beckerman e Lizarralde (1993) em alguns casos não conseguiram a extração de DNA, devido ao mau armazenamento e à deteriorização do material coletado.

4 METODOLOGIA

4.1 PARADIGMA

Esta pesquisa foi realizada através do paradigma tradicional, quantitativo, com uma abordagem descritiva, comparativa, relacional.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES ESTUDADOS

Grupo Teste:

O grupo teste foi constituído de 140 pacientes portadores de FLP-NS de ambos os gêneros, com idades entre sete meses e 50 anos. Participaram da pesquisa os indivíduos que aceitaram e após assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo A). Em cada paciente foi realizado exame clínico detalhado por uma médica geneticista, cujas informações foram coletadas conforme ficha clínica (anexo B), sendo selecionados apenas aqueles que não possuíam qualquer outra malformação associada. Desses pacientes, foi coletada uma amostra de células da mucosa jugal, por meio de raspagem com *swab*, e a seguir extraído o DNA. A extração do DNA genômico do material coletado com *swab* foi realizada de acordo com o protocolo exposto no anexo C.

Grupo Controle:

O grupo controle está constituído por 142 indivíduos hígidos, cujo material coletado para a extração de DNA foi obtido para testes de investigação de paternidade no ano de 2002 no Serviço de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Esse material é estocado em condições adequadas no Biobanco de DNA do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Faculdade de Biociências da PUCRS e serve de grupo controle para todas as pesquisas lá realizadas. É um

grupo de adultos saudáveis, de ambos os gêneros, que estão dissociados dos dados de identificação dos sujeitos doadores.

4.3 GENOTIPAGEM

Foi feita a genotipagem do polimorfismo *Taq I* do gene *TGFA* da seguinte maneira:

A determinação genética do polimorfismo *TGFA/Taq I* foi realizada usando a tecnologia de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em termociclador PTC-100 *Peltier-Effect Cycling MJ Research Inc.* usando *primers*¹² flanqueantes ao polimorfismo de interesse.

Para amplificar o segmento de DNA com 178pb contendo o sítio polimórfico TCGA foram utilizados os *primers forward*: 5' - TCA CTT CCC CTT TTT CAT CTG - T3' e *reverse* 5' - CGA GGA GGC TCT GAG GTG - 3' (Quadro 1). Para uma reação de 25µl de volume final foram usados 10 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 10µM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 50 mM de MgCl₂, 1,5 unidades de *Taq* Polimerase e 0,1 A 1ng de DNA. As condições da PCR consistiram em um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 36 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento em 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 10 segundos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Cerca de 5µl do volume do produto da amplificação foi visualizado, usando um marcador com peso molecular de 123pb, para verificar a amplificação adequada do fragmento. Para a genotipagem dos indivíduos, um volume de 20µl do produto de PCR foi digerido com 10 unidades da enzima de restrição *Taq I* e tampão (10mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂, 100mM NaCl e 0,1ng/ml BSA), ambos fornecidos pela fabricante (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland), a 65° C durante 3 horas, e o produto desta digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2%. O genótipo *TGFA/Taq I*

¹² *Primer*: um oligonucleotídeo curto, geralmente de 15 a 25 nucleotídeos de comprimento, que se pareia especificamente com uma seqüência-alvo para permitir que uma enzima polimerase inicie a síntese de uma fita de DNA complementar. Também chamado iniciador.

de cada indivíduo foi, então, determinado pelo tamanho dos fragmentos no gel de agarose (Figura 9). Foi realizada a análise de cada amostra de pacientes, determinando a presença de mutações gênicas no locus em estudo. O mesmo procedimento de amplificação por PCR e digestão enzimática foi aplicado ao grupo controle.

Seqüência	PCR	Digestão
Alelo selvagem (C1) 416 TCACT TCCCTTTT CATCTGTAAA AGGAGGAATT TGGCCTATGA 461 AAGG7CTCTA ATGACCTTAA AACCCCTAGA TCCTATGATC TTCATTTTAAGT 511 TTACCTTGTT TCCTGGATAT TTTCGCCAAC ATCCATGAAG ACATCAGGAT 561 GTGGGGCCCA GCTTGCGAGG AGGCTCTGAG GTG	178 pb	178 pb não digere
Alelo mutante (C2) 416 TCACT TCCCTTTT CATCTGTAAA AGGAGGAATT TGGCCTATGA 461 AAGG7CTC - - - GACCTTAA AACCCCTAGA TCCTATGATC TTCATTTTAAGT 511 TTACCTTGTT TCCTGGATAT TTTCGCCAAC ATCCATGAAG ACATCAGGAT 561 GTGGGGCCCA GCTTGCGAGG AGGCTCTGAG GTG	174 pb	122 pb 52 pb

Quadro 1 – Representação da seqüência de DNA do polimorfismo *TGFA/Taq I* nos seus dois alelos. A região dos *primers* está em verde. A região polimórfica (em vermelho) existe apenas no alelo C1 já que o alelo C2 mostra deleção dessas 4 bases (TAAT), permitindo que a enzima *Taq I* clive a região, uma vez que essa enzima reconhece a seqüência TCGA (em azul) onde é feito o corte. Na reação de PCR o produto amplificado é de 178pb no alelo C1 e 174pb no alelo C2. Após a digestão o alelo C1 permanece com o mesmo tamanho e o alelo C2 passa a apresentar dois fragmentos, um com 122pb e outro com 52pb.

Fonte: TANABE et al., (2000)

A região do gene *TGFA* digerida pela enzima de restrição *Taq I* apresenta dois tipos de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)¹³: um apresenta um local de restrição para a *Taq I* devido à falta das bases TAAT (alelo C2) e outro mostra a presença dessa seqüência (alelo C1) (Tanabe et al., 2000).

A visualização dos genótipos foi através de análise dos segmentos de DNA amplificados e digeridos com a enzima de restrição *Taq I*. Após esse procedimento foi realizada a análise eletroforética em gel de agarose (2%) / brometo de etídio / TBE com transiluminador ultra-violeta.

¹³ É um polimorfismo na seqüência do DNA, que pode ser detectado com base em diferenças no tamanho de fragmentos de DNA produzidos pela ação de uma enzima de restrição específica.

Quando o produto da PCR e o marcador são colocados no gel e deixados migrarem, as bandas maiores, como são mais pesadas, migram menos. Então, pode ser observado que as bandas do polimorfismo *TGFA/Taq I* (178pb) estão situadas entre as bandas de 123 e 246pb do marcador; sendo assim, averiguamos a correta amplificação gênica.

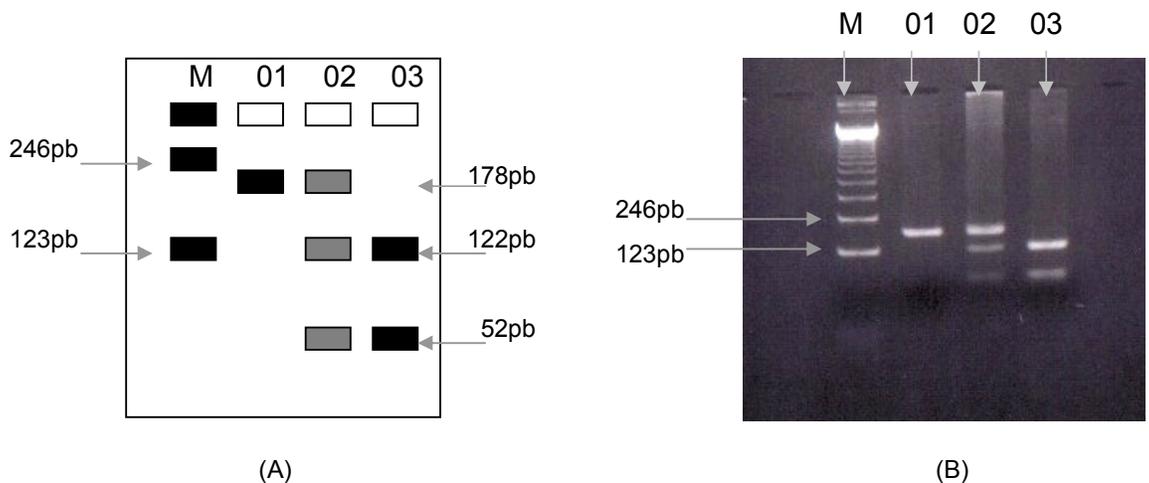


Figura 9 - Representação esquemática (A) e fotografia (B) da análise eletroforética em gel de agarose 2% com brometo de etídio da digestão do gene *TGFA*. O produto amplificado por PCR (178 e 174 pares de bases) foi digerido com a enzima de restrição *Taq I*. M = padrão de bandas do marcador de peso molecular de 123 pb, 01 = padrão de bandeamento esperado para o indivíduo homocigoto *C1C1* em que a enzima *Taq I* não reconhece o sítio de clivagem nos dois cromossomos, 02 = padrão de bandeamento esperado para indivíduos heterocigotos *C1C2* em que a enzima *Taq I* reconhece o sítio de clivagem em apenas um dos cromossomos e 03 = padrão de bandeamento esperado para indivíduos homocigotos *C2C2* em que a enzima *Taq I* reconhece o sítio de clivagem nos dois cromossomos.

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

4.4 COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE DNA ATRAVÉS DE SANGUE PERIFÉRICO E SWAB BUCAL:

A extração do DNA dos pacientes portadores de FLP foi realizada a partir de células da mucosa jugal, coletadas com *swab* bucal, conforme protocolo no anexo 3. Nos pacientes do grupo controle, o material utilizado consistiu em leucócitos do sangue periférico, seguindo a técnica descrita no protocolo do anexo 4. Foi realizado teste prévio comparativo com os dois tipos de material (sangue e *swab*) em três

indivíduos sadios. Foram feitas PCR, digestão e checagem genotípica dessa amostras, constatando-se ser possível a utilização e a comparação dos dois métodos.

4.5 SEQÜENCIAMENTO DO GENE *TGFA*

Para a confirmação da correta amplificação do segmento de DNA correspondente ao polimorfismo *TGFA/Taq I* foi feita uma reação de seqüenciamento em um indivíduo heterozigoto (*C1C2*). Essa reação é similar a uma reação da PCR, onde uma pequena amostra de DNA é amplificada milhares de vezes *in vitro*, porém de forma diferente da reação da PCR, apenas um *primer* é utilizado por vez para a síntese das fitas, no seqüenciamento de DNA. Durante a reação, o *primer* liga-se à seqüência complementar e os nucleotídeos são incorporados de acordo com a fita-molde. Ocorre tanto a incorporação dos nucleotídeos livres (dNTPs idem aos utilizados na reação normal da PCR) quanto a de nucleotídeos marcados com fluorescência. Esses nucleotídeos são chamados de nucleotídeos de terminação, porque, cada vez que um deles é incorporado, a leitura da fita-molde é interrompida, gerando um fragmento de tamanho respectivo ao local onde o nucleotídeo de terminação foi incorporado. No final da reação são gerados fragmentos de vários tamanhos diferentes. Tais fragmentos são submetidos à eletroforese, após a purificação, e lidos por um feixe de *laser* no seqüenciador automático de DNA (FIGUEIREDO et al., 2003).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação, entre os grupos, das variáveis quantitativas foi utilizado o teste *Qui-quadrado*. Para a realização do teste foi retirado o genótipo *C2C2*, pois apenas um caso observado o possui. Para o processamento e análise desses dados foi utilizado o *software* estatístico SPSS versão 10.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FREQUÊNCIAS GÊNICA E GENOTÍPICA

Em relação ao polimorfismo *TGFA/ Taq I*, a maioria dos pacientes (114 ou 81,4%) apresentou o genótipo *C1C1*, ou seja, os dois alelos selvagens. Vinte e cinco deles (17,9%), foram genotipados como *C1C2*, um dos alelos selvagem e o outro mutante. Somente em um paciente (0,7%) foi detectada a presença de dois alelos mutantes: *C2C2*. Esse indivíduo foi retirado da amostra para a análise estatística por se tratar de um único caso, pois poderia comprometer os resultados de qualquer teste estatístico (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo o genótipo para o polimorfismo *TGFA* na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Genótipo	Nº Pacientes	%
<i>C1C1</i>	114	81,4
<i>C1C2</i>	25	17,9
<i>C2C2</i>	1	0,7
Total	140	100,0

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

A tabela 2 mostra a frequência gênica, do polimorfismo *TGFA/Taq I* nos pacientes investigados. Nessa tabela pode ser observado que os alelos *C1* e *C2* apresentaram as frequências de 0,9036 e 0,0964, respectivamente. O quadro 2 mostra uma comparação dos estudos realizados por vários autores com o marcador polimórfico *TGFA/Taq I* em pacientes com FLP-NS. As frequências variam de 0,85 a 0,95 para o alelo selvagem (*C1*) e 0,05 a 0,15 para o mutante. Os resultados da presente pesquisa encontram-se entre os limites encontrados pelos demais autores comparados.

Tabela 2 - Distribuição da frequência alélica do gene *TGFA* nos indivíduos portadores de FLP-NS na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Alelos	Nº Cromossomos	Frequência
C1	253	0,9036
C2	27	0,0964
Total	280	1

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

Autor(ano)	População	Nº afetados	Nº controles	Tipo estudo	Frequência gênica	
					C1	C2
Ardinger et al. (1989)	Iowa (EUA)	78	98	Caso-controle	0,87	0,13
Hwang et al. (1995)	Maryland (EUA)	183	284	Caso-controle	0,88	0,12
Lidral et al. (1997)	Iowa (EUA)	1.518	1.552	Caso-controle	0,92	0,08
Lidral et al. (1998)	Iowa (EUA)	502	428	Caso-controle	0,89	0,11
Christensen et al. (1999)	Dinamarca	302	567	Caso-controle	0,87	0,13
Tanabe et al. (2000)	Japão	43	73	Caso-controle	0,88	0,12
Jugessur et al. (2003a)	Noruega	262	524	Familiar	0,85	0,15
Slayton et al. (2003)	Iowa (EUA)	120	502	Caso-controle	0,90	0,10
Passos-Bueno et al. (2004)	São Paulo e Ceará (Brasil)	536	412	Caso-controle	0,95	0,05
Presente estudo	Rio Grande do Sul (Brasil)	140	142	Caso-controle	0,90	0,10

Quadro 2 – Distribuição das frequências dos alelos C1 e C2 do polimorfismo *TGFA/Taq I* em diferentes estudos

5.2 GÊNERO

A tabela 3 mostra a distribuição de pacientes entre os gêneros. Pode ser observada uma predominância do gênero feminino (86 pacientes, 61,4%), em relação ao masculino (54 pacientes, 38,6%), estabelecendo uma proporção de 1,59:1.

Os dados referentes ao gênero não constam na maioria dos estudos de FLP-NS avaliados. No entanto, para Vieira et al. (2004), existe uma maior prevalência de indivíduos do gênero feminino assim como na presente pesquisa. Porém, para Marazita et al. (2002), essa proporção se inverte e para Peanchitlertkajorn et al. (2003) elas praticamente se equivalem.

Tabela 3 – Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo o gênero acometido na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Gênero	Nº Pacientes	%
Feminino	86	61,4
Masculino	54	38,6
Total	140	100,0

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

Considerando a distribuição genotípica do polimorfismo aqui estudado em relação ao gênero, foi observado que entre pacientes com genótipo *C1C1*, 63,2% eram do gênero feminino e 36,8% do masculino. Os pacientes com genótipo *C1C2* eram, em 52,0% dos casos, do gênero feminino e em 48,0% do masculino. O genótipo *C2C2* foi encontrado em apenas uma paciente do gênero feminino. Não foi constatada associação significativa ($\chi^2 = 1,07$; $p > 0,05$) entre o genótipo e o gênero dos pacientes (tabela 4). Da mesma forma Passos-Bueno et al. (2004), analisando três populações distintas no Brasil: São Paulo (capital), interior de São Paulo (Bauru, que possui um centro de referência para o tratamento de FLP) e Ceará, também não encontraram relação positiva entre gênero e distribuição genotípica em nenhuma das populações averiguadas.

Tabela 4 - Distribuição do genótipo para o polimorfismo *TGFA* em relação ao gênero do indivíduo afetado na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Gênero	Genótipo			Total
	<i>C1C1</i>	<i>C1C2</i>	<i>C2C2</i>	
Feminino	72 (63,2%)	13 (52,0%)	1 (100%)	86 (61,4%)
Masculino	42 (36,8%)	12 (48,0%)	-	54 (38,6%)
Total	114 (100%)	25 (100%)	1 (100%)	140 (100%)

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

5.3. PROCEDÊNCIA

Em relação à procedência dos pacientes, 60,7% dos casos eram provenientes da capital e da região metropolitana e 39,3% do interior do estado do Rio Grande do Sul (tabela 5). Marrero et al. (2005) consideram essa divisão importante porque a população do interior do Estado, principalmente a região nordeste, possui uma ancestralidade eurobrasileira maior em relação à procedente da capital e região metropolitana. Mutações estatisticamente significativas no locus *TGFA* são encontradas preferencialmente em populações caucasóides (ARDINGER et al., 1989; CHENEVIX-TRENCH et al., 1991, HOLDER et al., 1992; SHIANG et al., 1993, HWANG et al., 1995; CHRISTENSEN et al., 1999; JUGESSUR et al., 2003a; MARAZITA et al., 2004). A população do Rio Grande do Sul foi a que recebeu a maior imigração européia no Brasil (MARRERO et al., 2005), diferindo dos estados de outras regiões que possuem uma ancestralidade africana significativa. Sendo assim, a população sul-riograndense, principalmente a do interior, teria uma probabilidade maior de possuir a mutação no gene *TGFA* quando utilizada a enzima de restrição *Taq I*.

Tabela 5 - Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo a procedência na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Procedência	Nº Pacientes	%
Capital e região metropolitana	85	60,7
Interior	55	39,3
Total	140	100,0

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

Na análise da procedência dos pacientes, 61,4% dos indivíduos que possuem o genótipo *C1C1* são da capital e região metropolitana e 38,6% provenientes do interior do Estado. Por sua vez, 56% dos indivíduos com genótipo *C1C2* são da capital e 44% do interior (Tabela 6). Não foi encontrada, portanto, associação significativa entre o genótipo e a procedência dos pacientes. ($\chi^2=0,25$; $p>0,05$)

Tabela 6 - Distribuição do genótipo para o polimorfismo *TGFA* em relação à procedência do indivíduo afetado na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Procedência	Genótipo			Total
	<i>C1C1</i>	<i>C1C2</i>	<i>C2C2</i>	
Capital e região metropolitana	70 (61,4%)	14 (56,0%)	1 (100%)	85 (60,7%)
Interior	44 (38,6%)	11 (44,0%)	-	55 (39,3%)
Total	114 (100%)	25 (100%)	1 (100%)	140 (100%)

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

5.4 RECORRÊNCIA FAMILIAR E CONSANGÜINIDADE ENTRE OS PAIS DOS AFETADOS

Na maioria dos pacientes avaliados (57,9%) esse era o primeiro caso de FLP na família (Tabela 7). Porém, em 42,1% dos casos havia pelo menos um caso de recorrência familiar, com parentesco de 1º, 2º, 3º ou 4º graus, entre os afetados. De acordo com Beaty et al. (1997), famílias multiplamente afetadas podem ser mais adequadas para pesquisar fatores genéticos envolvidos em FLP, enquanto famílias com um único indivíduo afetado podem ser mais adequadas para definir os fatores de risco ambientais.

Os resultados desta pesquisa estão em harmonia com os estudos de Passos-Bueno et al. (2004) e Suzuki et al. (2004), que também encontraram maior proporção de casos isolados de FLP-NS, 81,3% e 96%, respectivamente, ao contrário de Blanco et al. (1998), que referiram um número maior de casos de recorrência familiar (52,1%).

Tabela 7 - Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo a presença de outro(s) afetado(s) na família dos pacientes estudados em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Outro(s) afetado(s)	Nº Pacientes	%
Sim	59	42,1
Não	81	57,9
Total	140	100,0

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

A tabela 8 mostra a distribuição dos genótipos para o polimorfismo *TGFA/Taq I* em relação à recorrência familiar. Pode ser observado que 41,2% dos indivíduos *C1C1* apresentam um ou mais membros da família com a mesma malformação, sendo que em 58,8% dos casos o paciente é o primeiro afetado da família. Da mesma forma, 48% dos que possuem o genótipo *C1C2* têm mais algum afetado na família e 52%, não. Não foi encontrada associação significativa entre o genótipo e a presença de outros afetados nas famílias dos pacientes. Passos-Bueno et al. (2004) também não encontraram associação entre casos isolados ou familiares e o genótipo mutante, em nenhuma das populações estudadas (São Paulo/SP, Bauru/SP e Ceará).

Tabela 8 - Distribuição do genótipo para o polimorfismo *TGFA* em relação à presença de outro(s) afetado(s) na família na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Outro(s) Afetado(s) na Família	Genótipo			Total
	<i>C1C1</i>	<i>C1C2</i>	<i>C2C2</i>	
Sim	47 (41,2%)	12 (48,0%)	-	59 (42,1%)
Não	67 (58,8%)	13 (52,0%)	1 (100%)	81 (57,9%)
Total	114 (100%)	25 (100%)	1 (100%)	140 (100%)

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

Não foi encontrada consangüinidade na maioria das famílias dos pacientes (97,1%). Em apenas quatro famílias havia consangüinidade, caracterizada pelos pais serem primos em até 5º grau. Nenhum dos indivíduos com genótipo *C1C2* possuía família consangüínea e 3,5% dos que têm genótipo *C1C1* as possuíam (tabela 9). Não foi encontrada associação significativa entre o genótipo e a consangüinidade entre as famílias dos pacientes, diferentemente de Marazita et al. (2004) que, em um estudo com famílias consangüíneas na Turquia, mostrou que o marcador D2S1777, no cromossomo 2 (2p11.1), localizado muito próximo do 2p13 (*TGFA*), estava fortemente envolvido na etiologia das FL/P ($p < 0.05$). Os casamentos consangüíneos são importantes em malformações congênitas, como as FLP, uma vez que essa condição aumenta o risco de recorrência da anomalia em filhos de casais consangüíneos. O risco maior é para filhos de consangüíneos de primeiro grau (filho-genitor e irmãos) caindo bruscamente para parentes em segundo grau e

gradualmente do terceiro grau em diante pois trata-se de uma característica de herança multifatorial (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2002).

Tabela 9 - Distribuição dos genótipos para o polimorfismo *TGFA* em relação à consangüinidade nas famílias afetadas na população estudada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Consangüinidade	Genótipo			Total
	<i>C1C1</i>	<i>C1C2</i>	<i>C2C2</i>	
Sim	4 (3,5%)	-	-	4 (2,9%)
Não	110 (96,5%)	25 (100%)	1 (100%)	136 (97,1%)
Total	114 (100%)	25 (100%)	1 (100%)	140 (100%)

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

5.5 TIPO DE FISSURA

A tabela 10 mostra a distribuição do número de pacientes de FLP-NS da amostra estudada, de acordo com o tipo de fissura. As fissuras labiais e palatinas associadas foram encontradas em 84,3% dos pacientes; a fissura labial isolada em 10,7% e a fissura palatina isolada em 5,0%. Quando analisadas, em conjunto, as fissuras labiais com ou sem envolvimento palatino perfazem um total de 95,0.

Tabela 10 - Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo o tipo de fissura acometida na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Fissura	Nº Pacientes	%
Fissura labial	15	10,7
Fissura labiopalatina	118	84,3
Fissura palatina	7	5,0
Total	140	100,0

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

Esses achados encontram-se em harmonia com os dados da literatura, uma vez que numa revisão de estudos epidemiológicos das FLP, na Europa e nas Américas, foi observado que em pacientes não-sindrômicos há maior prevalência de fissuras de lábio com ou sem envolvimento do palato (FL/P) do que fissuras de palato

isoladas (FP) (VIEIRA; ORIOLI, 2001). Dos 183 pacientes avaliados por Hwang et al. (1995) em Maryland (EUA) com FLP-NS, 38% foram diagnosticados com FP e 62% como FL/P. Lidral et al. (1997), analisando a população de Iowa (EUA), encontrou que 76% dos casos eram de FL/P e 24% de FP. Para Beaty et al. (1997), na população de Maryland (EUA), 40,1% dos casos se referiam a FP e 59,9% às FL/P, sendo que quando estas últimas eram analisadas separadamente, 15,6% eram apenas FL e 44,3% FLP. Para os mesmos autores na mesma população em 2002, 30,6% dos indivíduos possuíam FP e 69,4% FL/P (21,8% eram FL e 47,6% FLP). No estudo de Suzuki et al. (2004), 9,1% dos pacientes eram portadores de FP e 90,9% de FL/P (28,6% de FL e 62,3% de FLP).

Pode ser observado que a distribuição dos casos de FLP-NS em relação ao tipo de fissura segue o mesmo padrão das FLP em geral. Loffredo, Freitas e Grigolli (2001) observaram que, do total de 16.853 casos de FLP registrados nos últimos 20 anos no Brasil, 4.413 (26%) se referiram à FP e 12.440 (74%) eram de FL/P. Em um estudo de recém-nascidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS no período entre 1983 e 1993, Collares et al. (1995) encontraram que as FP foram responsáveis por 26,8% dos casos, FL por 34,1% e FL/P por 39,1%. Além disso, as FL/P no estudo de Furlaneto e Pretto (2000) foram as mais frequentes (84,45%), seguidas pelas FP (12,90%).

Deve ser considerado que muitas vezes os pacientes com FL isolada não são tratados em serviços de atendimento odontológico, pois esses pacientes não apresentam defeitos dentários e podem ser tratados, com sucesso, por um cirurgião plástico, com resultado bastante satisfatório ainda bebês, não requerendo tratamento e acompanhamento posterior (BEATY et al., 1997), ou seja, pode existir viés de seleção em pesquisas epidemiológicas de FLP.

Foi encontrado, na presente investigação, que dos indivíduos com genótipo C1C1, 5,3% possuem FP e 94,7% FL/P. O genótipo C1C2 aparece somente nos indivíduos com FL/P (tabela 11). Mesmo assim, não foi encontrada associação estatisticamente significativa, entre o genótipo e o tipo de fissura dos pacientes. ($\chi^2=1,37$; $p>0,05$)

Tabela 11 - Distribuição dos genótipos para o polimorfismo *TGFA* em relação ao tipo de fissura do indivíduo afetado considerando-se FL/P e FP, na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Fissura	Genótipo			Total
	C1C1	C1C2	C2C2	
Fissura Palatina	6 (5,3%)	-	1 (100%)	7 (5%)
Fissura Labiopalatina + Fissura Labial	108 (94,7%)	25 (100%)		133 (95%)
Total	114 (100%)	25 (100%)	1 (100%)	139 (100%)

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

Ardinger et al. (1989), Chenevix-Trench et al. (1991), Holder et al. (1992) e Jara (1995) encontraram associação entre o gene *TGFA* e FL/P. Já Lidral et al. (1997 e 1998), Christensen et al. (1999), Slayton et al. (2003) e Passos-Bueno et al. (2004) não observaram associação da malformação com o genótipo mutante no gene *TGFA*, quando usada a enzima *Taq I*, assim como no presente estudo.

Shiang et al. (1993) e Hwang et al. (1995) encontraram associação apenas quando se tratava de fissura palatina isolada. Jugessur et al. (2003a) afirmaram que quando um indivíduo é homozigoto para o alelo C2 ele possui um risco três vezes maior de possuir FP. Nesta pesquisa o único indivíduo com genótipo C2C2 é portador de FP, porém como se trata de um caso isolado não se pode afirmar que esse genótipo seja o causador da fissura. Uma amostra maior de casos de FP seria necessária para esta comprovação.

5.6. LADO ACOMETIDO

Na tabela 12 é apresentada a distribuição dos pacientes portadores de FLP-NS segundo o lado acometido. A maior prevalência de fissuras ocorreu apenas no lado esquerdo (49,3%). As fissuras bilaterais foram encontradas em 30,0% dos pacientes e as no lado direito em 20,7% deles. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Vieira e Orioli (2001) e Furlaneto e Pretto (2000) que relatam ser o lado esquerdo duas vezes mais afetado do que o direito, aproximadamente.

Tabela 12 - Distribuição do número de pacientes portadores de FLP-NS segundo o lado acometido, na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Lado	Nº Pacientes	%
Direito	29	20,7
Esquerdo	69	49,3
Bilateral	42	30,0
Total	140	100,0

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

Quando são analisados os genótipos, para o polimorfismo aqui estudado, em relação ao lado de ocorrência da fissura no indivíduo verifica-se que, daqueles com genótipo *C1C1*, 21,1% possuem a fissura no lado direito, 48,2% no lado esquerdo e 30,7% em ambos os lados. Já dos que têm o genótipo *C1C2*, 20% apresentam a fissura à direita, 56% à esquerda e 24% nos dois lados (tabela 13). Não foi encontrada associação significativa entre o genótipo e o lado de ocorrência da fissura. ($\chi^2=0,57$; $p>0,05$)

Tabela 13 - Distribuição dos genótipos para o polimorfismo *TGFA* em relação ao lado da fissura do indivíduo afetado, na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Lado	Genótipo			Total
	<i>C1C1</i>	<i>C1C2</i>	<i>C2C2</i>	
Direito	24 (21,1%)	5 (20,0%)	-	29 (20,7%)
Esquerdo	55 (48,2%)	14 (56,0%)	-	69 (49,3%)
Bilateral	35 (30,7%)	6 (24,0%)	1 (100%)	42 (30,0%)
Total	114 (100%)	25 (100%)	1 (100%)	140 (100%)

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

5.7. COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE AFETADOS E O GRUPO CONTROLE EM RELAÇÃO À DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS *C1C1*, *C1C2* E *C2C2*

Na comparação entre os grupos de pacientes e controles foi observada uma prevalência menor de indivíduos com genótipo *C1C1* (114, 81,4%) no grupo de pacientes do que no grupo controle (121; 85,2%). O genótipo *C1C2* foi o segundo

mais encontrado: 25 (17,9%) e 21 (14,8%) dos grupos caso e controle, respectivamente, e apenas um indivíduo do grupo caso (0,4%) possuía o genótipo C2C2, não encontrado no grupo controle (Tabela 14 e Gráfico 1). Não foi encontrada associação significativa entre as amostras de pacientes e controles ($\chi^2=0,52$; $p>0,05$).

Tabela 14 - Comparação dos genótipos para o polimorfismo *TGFA* entre os pacientes e o grupo controle na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005

Genótipo	Grupo		Total
	Caso	Controle	
C1C1	114 (81,4%)	121 (85,2%)	235 (83,3%)
C1C2	25 (17,9%)	21 (14,8%)	46 (16,3%)
C2C2	1 (0,7%)	-	1 (0,4%)
Total	140 (100%)	142 (100%)	282 (100%)

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

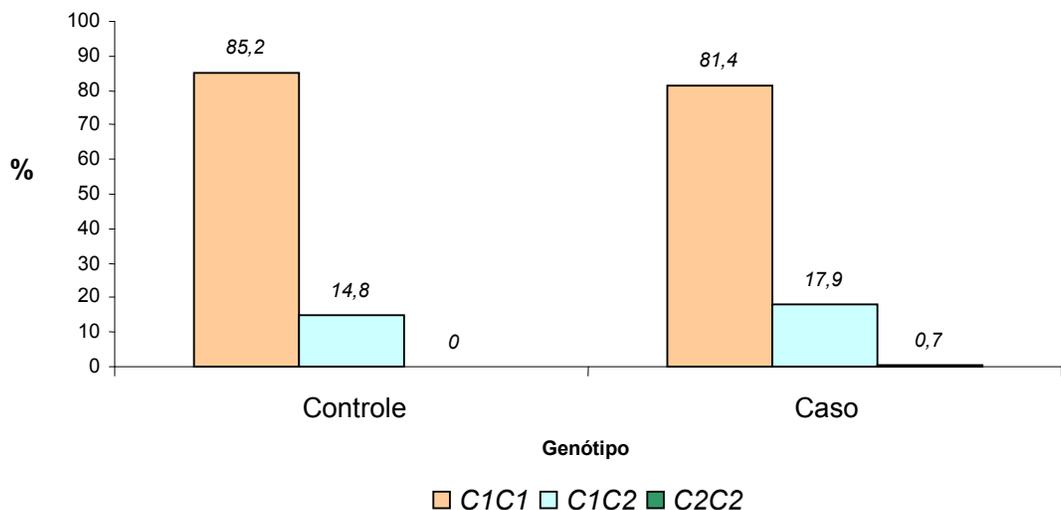


Gráfico 1 - Comparação das frequências genotípicas do polimorfismo *TGFA* entre os pacientes e o grupo controle na amostra investigada, em Porto Alegre/RS, no ano de 2005.

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

O quadro 3 apresenta estudos que analisaram o gene *TGFA* em variadas populações, alguns utilizando a enzima de restrição *Taq I* e outros seqüenciamento

direto. Em relação ao tamanho da amostra percebe-se que a presente pesquisa, com 142 indivíduos avaliados, possui um tamanho compatível com outros semelhantes, já que o número de probandos variou de 43 a 1518 em estudos de caso-controle. A falta de associação estatística, assim como nesta pesquisa, foi prevalente nos estudos avaliados.

Desde a publicação do trabalho de Ardinger et al. (1989), vários estudos em populações caucasóides têm mostrado associação entre o marcador polimórfico *TGFA/Taq I* e FLP. Uma comparação direta entre os diversos estudos se torna difícil, porque são usados marcadores e amostras populacionais diferentes. Embora alguns estudos publicados mostrem uma associação positiva entre as FLP-NS e as mutações do gene *TGFA/Taq I*, o mecanismo biológico que explica essa associação não está claro, uma vez que o marcador *TGFA/Taq I* é um alelo polimórfico situado em uma região inexpressiva do gene, o intron (BEATY et al., 1997).

Esses últimos autores, bem como Lidral et al. (1997 e 1998), Christensen et al. (1999), Tanabe (2000), Slayton et al. (2003) e Passos Bueno et al. (2003) também não encontraram diferença estatisticamente significativa entre o locus *TGFA* e FLP, quando foi usada a enzima de restrição *Taq I* na comparação entre pacientes e grupos controles, ou em estudos familiares, assim como na presente pesquisa. Stoll et al. (1993), Ballew, Beckerman e Lizarralde (1993), Shaw et al. (1998), Beaty et al. (2002), Marazita et al. (2002), Field et al. (2004), Schultz et al. (2004), Suzuki et al. (2004) e Suazo et al. (2005) também não encontraram essa associação, usando outros marcadores para o mesmo locus, como mostra o quadro 3. Ainda como Shaw et al. (1998) e Beaty et al. (1997), o alelo C2 apresentou frequência mais baixa nos grupos controles, porém sem significância estatística.

De acordo com Passos-Bueno et al. (2004) o *TGFA* não é um locus modificador relevante para a incidência de FL/P nas regiões sudeste e nordeste brasileiras. A população brasileira representa uma mistura étnica tribrida de eurobrasileiros, afrobrasileiros e ameríndios, o que torna muito difícil relacionar perfeitamente a etnia de casos e controles. Especulava-se que, devido à diferença entre a colonização das regiões sul (européia, preferentemente) e nordeste (africana principalmente) e à intensa migração de nordestinos para a região sudeste, pudesse haver diferença da distribuição genotípica do Rio Grande do Sul, uma vez que mutações no gene *TGFA* são predominantemente encontradas em populações caucasóides. Pode-se

Autor (ano)	População	Nº afetados	Nº controles	Tipo estudo	Tipo de Análise	Associação Estatística
Ardinger et al. (1989)	Iowa (EUA)	78	98	Caso-controle	RFLP	S
Hwang et al. (1995)	Maryland (EUA)	183	284	Caso-controle	RFLP	S
Beaty et al. (1997)	Maryland (EUA)	149	138	Caso-controle	RFLP	NS
Lidral et al. (1997)	Iowa (EUA)	1.518	1.552	Caso-controle	RFLP	NS
Lidral et al. (1998)	Iowa (EUA)	502	428	Caso-controle	RFLP	NS
Shaw et al. (1998)	Califórnia (EUA)	571	640	Caso-controle	RFLP	S
Christensen et al. (1999)	Dinamarca	302	567	Caso-controle	RFLP	NS
Prescott et al. (2000)	Reino Unido	92	271	Familiar	Seqüenciamento	S
Tanabe et al. (2000)	Japão	43	73	Caso-controle	RFLP	S
Mitchell et al. (2001)	Dinamarca	266	473	Caso-controle	RFLP	NS
Beaty et al. (2002)	Maryland (EUA)	269	538	Caso-controle	Seqüenciamento	NS
Marazita et al. (2002)	China	145	526	Familiar	Seqüenciamento	NS
Jugessur et al. (2003a)	Noruega	262	524	Familiar	RFLP	S
Slayton et al. (2003)	Iowa (EUA)	120	502	Caso-controle	RFLP	NS
Field et al. (2004)	Índia	82	190	Familiar	Seqüenciamento	NS
Marazita et al. (2004)	Turquia	18		Familiar	Seqüenciamento	S
Passos-Bueno et al. (2004)	São Paulo e Ceará (Brasil)	536	412	Caso-controle	RFLP	NS
Schultz et al. (2004)	Filipinas	126	218	Familiar	Seqüenciamento	NS
Suzuki et al. (2004)	Vietnã	175	350	Familiar	Seqüenciamento	NS
Moreno et al. (2004)	Ohio (EUA) e Colômbia	26 123	39 198	Familiar	Seqüenciamento	S NS
Presente estudo	Rio Grande do Sul (Brasil)	140	142	Caso-controle	RFLP	NS

Quadro 3 – Representação de estudos que analisaram o gene *TGFA* em variadas populações. S = Significante; NS = Não significante

especular, então, que alguns efeitos de estratificação populacional poderiam causar a ausência de significação estatística do estudo de caso-controle em relação ao alelo *C2/TGFA*. Nesta pesquisa realizada na PUCRS, confirma-se que a discreta diferença na frequência do alelo *C2* entre pacientes e controles não é suficiente para levar em conta tal efeito (PASSOS-BUENO et al., 2004). Uma metanálise de estudos realizados até o ano de 1996 (MITCHELL, 1997) concluiu que havia uma grande evidência da associação entre FLP e o polimorfismo *TGFA/Taq I*. Essa associação seria, provavelmente, devida à gravidade da malformação e não às diferenças étnicas. Sendo assim, mutações nesse gene não estariam restritas às populações caucasóides.

Shiang et al. (1993) e Hwang et al. (1995) mostraram associação entre as FP e o polimorfismo *TGFA/Taq I*. Ardinger et al. (1989) encontraram os mesmos resultados, embora a população controle, utilizada por esses autores, não tenha sido homogênea. Schultz et al. (2004) mostraram primeiramente desequilíbrio de ligação entre *TGFA* e FLP, porém quando os autores aumentaram o tamanho da amostra essa correlação desapareceu. O trabalho de Moreno et al. (2004), que analisou duas populações distintas (Ohio/EUA e Colômbia), mostrou diferença estatisticamente significativa na comparação do polimorfismo *TGFA* e pacientes portadores de FLP na população norte-americana, não encontrando os mesmos resultados na população colombiana; isso sugere que havia heterogeneidade populacional na amostra por eles estudada, já que a primeira população é considerada caucasóide e a segunda uma mistura de eurodescendentes e ameríndios.

As fissuras são decorrentes da falta de união entre as proeminências nasais e maxilares, devido ao não fusão das massas mesenquimais e da não proliferação do mesênquima sob o epitélio subjacente (MOORE; PERSAUD, 2000). Sendo assim, a razão de não ter sido encontrada associação entre o gene *TGFA* e as FLP-NS pode ser explicada pelo fato de o gene em questão estar relacionado à produção epitelial, e o rompimento epitelial seria apenas uma consequência da malformação mesenquimal. O gene *TGFB3* seria um gene candidato às FLP mais apto que o *TGFA*, já que ele atua na morfogênese do palato, nas interações entre epitélio e mesênquima. Pode ser que o *TGFA* seja um coadjuvante ou modificador, como relatado por Prescott et al. (2000) e Suazo et al. (2005), na formação das FLP; nesses casos ele poderia agir sinergicamente com

outros genes, como o *TGFB3*, por exemplo, e então ser um dos responsáveis pela anomalia. Somente outras pesquisas poderão elucidar tal fato.

5.8 SEQÜENCIAMENTO DO GENE *TGFA*

Para a comprovação de que as amostras foram amplificadas para o lócus desejado foi realizada uma reação de seqüenciamento do DNA de um indivíduo genotipado como *C1C2*, após a digestão com a enzima de restrição *Taq I* com *primers* específicos e a visualização do genótipo em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio em eletroforese. Utilizando a ferramenta BLAST, que compara as seqüências de DNA com um banco genômico universalmente conhecido, confirmou-se que o fragmento estudado correspondia exatamente ao gene *TGFA* na espécie *Homo sapiens*. No seqüenciamento do fragmento de DNA amplificado do referido indivíduo (*C1C2*), pode ser visto que, a partir da deleção da seqüência nucleotídica TAAT há uma não correspondência dos pares de base nos dois cromossomos, o que confirma o genótipo antes realizado com a enzima de restrição *Taq I* (figura 10).

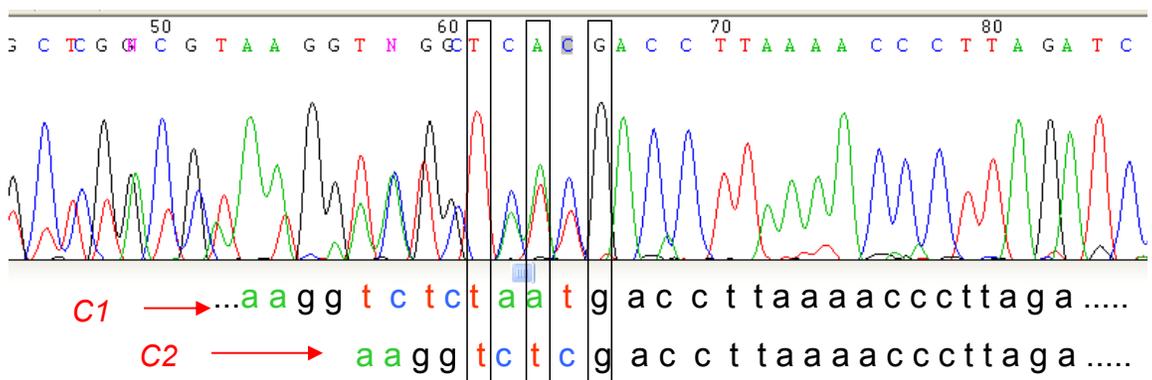


Figura 10 - Seqüenciamento de DNA de um indivíduo heterozigoto para o polimorfismo *TGFA*. Note-se a concordância nos pares de base à direita e, após a deleção TAAT em um dos cromossomos, a seqüência fica alterada.

Fonte:dados da Pesquisa (PUCRS/2006)

Muitas pesquisas têm utilizado apenas o seqüenciamento na testagem de genes candidatos às FLP-NS (PRESCOTT et al., 2000; BEATY et al., 2002; MARAZITA et al., 2002 e 2004; FIELD et al., 2004; SHULTZ et al., 2004; SUZUKI et

al., 2004; MORENO et al., 2004). Nesses casos pode-se fazer uma varredura genômica e encontrar-se novas mutações. A desvantagem desse método seria apenas o seu custo elevado.

5.9 COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA

Comparadas as metodologias de extração de DNA, a partir de sangue periférico e das células da mucosa jugal, foi constatado que é possível aplicar a técnica da PCR em ambas as amostras de DNA, obtendo-se um ótimo resultado. Entretanto, o método de obtenção de DNA por *swab* bucal se adequa mais aos procedimentos de investigação genética de pacientes portadores de FLP, uma vez que é um método de coleta menos invasivo e menos amedrontador, ou seja, mais fácil de os pacientes e seus responsáveis concordarem em participar desse tipo de pesquisa. Além disso, a obtenção do DNA por *swab* tem ainda a vantagem de ser mais rápida e menos dispendiosa do que a obtenção de DNA pelos métodos “*salting out*” ou *kit*. A figura 11 mostra o padrão da PCR, para o gene *TGFA*, entre as duas metodologias indicando claramente que a técnica de obtenção de DNA por *swab* bucal pode ser utilizada satisfatoriamente para o polimorfismo em questão. Os resultados desta pesquisa estão de acordo com Abrão et al. (2005), que mostraram semelhança entre os métodos de extração de DNA.

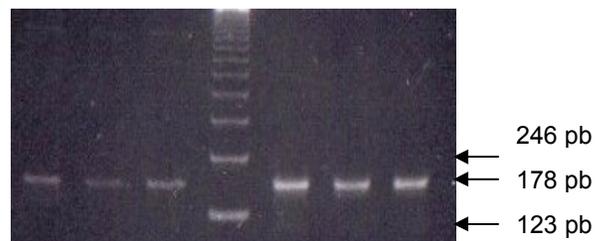


Figura 11 - Visualização da PCR com as técnicas de extração de DNA através de sangue periférico (esquerda) e *swab* bucal (direita) em um gel de agarose 1% com brometo de etídio em eletroforese. Na coluna central há o marcador de 123pb. Foi utilizado *blue juice* como corante para que a visualização no gel fosse conseguida. As bandas correspondentes ao polimorfismo *TGFA* (três à direita e três à esquerda) observadas possuem 178pb.

Fonte: dados da pesquisa (PUCRS/2006)

A maioria dos trabalhos aqui referidos utilizou como forma de obtenção de DNA o sangue periférico (ARDINGER, et al. 1989; BALLEW; BECKERMAN;

LIZARRALDE, 1993; HWANG et al., 1995; LIDRAL et al., 1997; BARBER et al., 1998; BLANCO et al., 1998 e 2001; SHAW et al., 1998 e 1999; TOLAROVA et al., 1998; CHRISTENSEN et al., 1999; EVERET et al., 1999; PRESCOTT et al., 2000; TANABE et al., 2000; MITCHELL et al., 2001, CARRENO et al., 2002; MARAZITA et al., 2002 e 2004; PEANCHITLERTKAJORN et al., 2003; FIELD et al., 2004; MORENO et al., 2004; SCHULTZ et al., 2004; SUZUKI et al., 2004). Vieira et al. (2004) adotaram somente a técnica de obtenção de DNA a partir de *swab* bucal. Já Wyszynski et al. (1997), Beaty et al. (1997 e 2002), Lidral et al. (1998), Jugessur et al. (2003a), Gaspar et al. (2004) e Passos-Bueno et al. (2004) realizaram as duas técnicas.

Independentemente da técnica utilizada, se a extração é bem executada, o material pode ser utilizado e trará resultados satisfatórios. Em todos os trabalhos a genotipagem foi realizada com sucesso, não importando se a extração de DNA tenha sido feita através de sangue periférico ou *swab* bucal. Apenas na pesquisa de Ballew, Beckerman e Lizarralde (1993), em alguns casos, não foi obtida a extração de DNA devido ao armazenamento inadequado e da deterioração do material coletado. O uso de *swab* bucal tem a vantagem de não necessitar de um acondicionamento especial, como é o caso do sangue; sendo assim, a coleta pode ser realizada em qualquer local, fato que não ocorre com a coleta de sangue periférico, que necessita de estocagem imediata em ambiente refrigerado.

Com o banco de DNA de pacientes com FLP-NS, cujo material genético encontra-se armazenado em condições adequadas (em tubos *ependorf* individuais, catalogados e a uma temperatura de -20°C), novos estudos poderão ser realizados para a testagem e a identificação de outros genes candidatos, principalmente aqueles que atuam no desenvolvimento embrionário, com ênfase ao período de formação do lábio e do palato, cujas mutações podem contribuir para o desenvolvimento dessas malformações.

Avanços na identificação de genes, cujos mutantes podem atuar no desenvolvimento das FLP, são importantes para melhorar o conhecimento da etiologia dessas malformações, tornando mais eficiente seu diagnóstico clínico e pré-natal, aprimorando, assim, seu tratamento e aconselhamento genético.

6 CONCLUSÕES

- a. As frequências gênicas dos alelos *C1* e *C2* do polimorfismo *TGFA/Taq I* na amostra de pacientes com FLP-NS da população do Rio Grande do Sul estudada, foram respectivamente, 0,90 e 0,10.
- b. Não foi encontrada associação entre mutações (alelo *C2*) no polimorfismo *TGFA/Taq I* de paciente com FLP-NS na população estudada.
- c. A extração do DNA a partir de células da mucosa jugal, coletadas com *swab* bucal, mostrou ser eficaz na determinação genotípica do polimorfismo *TGFA/Taq I* nos pacientes com FLP-NS estudados.
- d. O banco de DNA extraído de células da mucosa jugal dos pacientes com FLP-NS, cujo material genético está armazenado em condições adequadas, encontra-se apto e disponível para estudos de outros marcadores genéticos, na continuidade desta linha de pesquisa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos realizados com o objetivo de averiguar a existência de associação entre FLP-NS e marcadores genéticos podem contribuir para o conhecimento da evolução da patologia e identificar características herdadas responsáveis pelo aumento da suscetibilidade de um indivíduo às doenças multifatoriais como as FLP. Estudos de mutações em outros genes como *MSX1*, *IRF6* e *TGFB3*, por exemplo, podem fornecer argumentos que auxiliem os cirurgiões-dentistas na prática clínica, quando forem implantados programas de prevenção e controle das patologias bucofaciais. Presentemente os genes ainda não podem ser mudados, mas uma vez identificados, se tornará mais fácil, no futuro, direcionar as modificações para evitar os quadros patológicos. Assim, o conhecimento dos polimorfismos genéticos pode ter aplicabilidade na obtenção de indicadores genéticos que poderão auxiliar no diagnóstico, prevenção, tratamento e aconselhamento genético das pessoas portadoras da malformação estudada, bem como de seus familiares.

REFERÊNCIAS*

ABRÃO, M.G. et al. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 49, n. 6, 2005.

ARDINGER, et al. Association of genetic variation of the transforming growth factor- α gene with cleft lip and palate. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 45, n. 3, p. 348-53, 1989.

BALLEW, C.; BECKERMAN, S.J.; LIZARRALDE, R. High prevalence of cleft lip among the Bari Indians of western Venezuela. **Cleft Palate-Craniofac. J.**, v. 30, n. 4, p. 411-3, 1993.

BARBER, R.C. et al. Lack of association between mutations in the folate receptor- α gene and spina bifida. **Am. J. Med. Genet.**, v. 76, n. 4, p. 310-7, 1998.

BEATY, T. H. et al. Testing for Interaction between Maternal Smoking and *TGFA* Genotype among Oral Cleft Cases Born in Maryland 1992 – 1996. **Cleft Palate-Craniofac. J.**, v. 34, n. 5, p. 447-54, 1997.

BEATY, T.H., et al. Testing candidates genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. **Genet. Epidemiol.**, v. 22, p. 1-11, 2002.

BLANCO, R.C. et al. La variación genética de *MSX1* presenta um dimorfismo sexual na fissura labiopalatina no síndrome em la población chilena. **Rev. Méd. Chile.** v. 126, n. 7, p. 1-8, 1998.

BLANCO, R.C. et al. Evidence of a sex-dependent association between the *MSX1* locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the chilean population. **Hum. Biol.** v. 73, n. 1, p. 81-9, 2001.

BORGES-OSÓRIO, M.; ROBINSON, W. **Genética Humana**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 460p.

CARINCI, F. et al. Genetics of nonsyndromic cleft lip and palate: a review of international studies and data regarding the italian population. **Cleft Palate-Craniofac. J.** v. 37, p.33-40, 2000.

CARRENO, H.Z. et al. Asociación entre fenótipo fisura labiopalatina no síndrome y marcadores de microsatélites ubicados em 6p, 17q y 19q. **Rev. Méd. Chile.** v. 130, n. 1, p. 35-44, 2002

* Texto redigido conforme as normas da ABNT NRB 6023 em vigor a partir de agosto de 2002.

- CARTER, C.O. Genetics of common disorders. **Br. Méd. Bull.** v. 25, p.52-7, 1969.
- CHENEVIX-TRENCH, G., et al. Further evidence for an association between genetic variation in transforming growth factor alpha and cleft lip and palate. **Am. J. Hum. Genet.** V.48, n.5, p. 1012-3, 1991.
- CHRISTENSEN, K. et al. Oral Clefts, Transforming Growth Factor Alpha Gene Variants, and Maternal Smoking: A Population-based Case-Control Study in Denmark, 1991-1994. **Am. J. Epidemiol.**, v. 149, n. 3, p. 248-55, 1999.
- CHUNG, C.S. et al. Segregation analysis of cleft lip with or without cleft palate: a comparison of Danish and Japanese data. **Am. J. Hum. Genet.** v. 39, p. 603-11, 1986.
- COLLARES, M.V.M. et. al. Fissuras Lábio-palatinas: incidência e prevalência da patologia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Um estudo de 10 anos. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, v. 39, n. 3, p. 183-188, 1995.
- EVERET, E.T. et al. A novel FGFR2 gene mutation in Crouzon Syndrome associated with apparent nonpenetrance. **Cleft Palate-Craniofac. J.**, v. 36, n. 6, p. 533-41, 1999.
- FIELD, L.L. et al. Genome scan for loci involved in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in families from West Bengal, India. **Am. J. Med. Genet.**, v. 130A, p. 265-71, 2004.
- FIGUEIREDO, G.S. et al. Reação de sequenciamento de DNA e purificação – protocolos otimizados. **Circular Técnica**. 1. ed. Brasília: Embrapa recursos gráficos e biotecnologia, 2003. p.1-4.
- FURLANETO, E. C. et al. Fissuras labiopalatais: aspectos epidemiológicos e etiologia – revisão da literatura. **Revista Odonto Ciência**, n.28, p. 121-8, 1999.
- FURLANETO, E.C.; PRETTO, S.M. Estudo epidemiológico dos pacientes atendidos no Serviço de Defeitos da Face da PUCRS. **Revista Odonto Ciência**, n.29, p. 39-56, 2000.
- FURLANETO, E.C.; ROBINSON, W.M.; BORGES-OSÓRIO, M.R. Anomalias associadas às fissuras labiopalatais em uma amostra de pacientes em tratamento no Serviço de Defeitos da Face da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. **Revista Odonto Ciência**, v. 18, n.39, p. 39-50, 2003.
- GASPAR, D.A. et al. Role of the C677T Polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case-control study in Brazil. **Am. J. Med. Genet.**, v. 87, p. 197-9, 1999.

- GASPAR, D.A. et al. Evidence that BCL3 plays a role in the etiology of nonsyndromic oral clefts in Brazilian families. **Genet. Epidemiol.**, v. 23, n.4, p. 364-74, Nov. 2002.
- GASPAR, D.A. et al. Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with *TGFA*, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 0, p. 1-6, 2004.
- HARKINS, C.S. et al. A classification of cleft lip and cleft palate. **Plast. Reconstr. Surg.** v. 29, p.31-9, 2006.
- HOLDER, S.E. et al. Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate. **J. Med. Genet.** v. 29, p. 390-2, 1992.
- HWANG, SJ, et al. Association Study of Transforming Growth Factor Alpha (*TGFA*) *Taq I* Polymorphism and Oral Clefts: Indication of Gene-Environment Interaction in a Population-based Sample of Infants with Birth Defects. **Am. J. Epidemiol.**, v. 141, n. 7, p. 629-636, 1995.
- JARA, L. et al. Association between alleles of the transforming growth factor alpha locus and cleft lip and palate in the Chilean population. **Am. J. Med. Genet.** v. 57, p. 548-51, 1995.
- JENSEN, B.L. et al. Cleft lip and palate in Denmark, 1976-1981: epidemiology, variability and early somatic development. **Cleft Palate J.**, v. 25, n. 3, p. 258-69, July 1988.
- JUGESSUR, A. et al. Variants of developmental genes (*TGFA*, *TGFB3* and *MSX1*) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. **Genet. Epidemiol.**, v. 24, n. 3, p. 230-9, 2003a.
- JUGESSUR, A. et al. Cleft palate, transforming growth factor alpha gene variants, and maternal exposures: assessing gene-environment interactions in case-parent triads. **Genet. Epidemiol.**, v. 25, n. 4, p. 367-74, 2003b.
- KONDO, S. et al. Mutations in *IRF6* cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. **Nat. Genet.** v. 32, n. 2, p. 285-9, 2002.
- LIDRAL, A.C. et al. Studies of the candidate genes *TGFB2*, *MSX1*, *TGFA* and *TGFB3* in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. **Cleft Palate-Craniofac. J.**, v. 34, n. 1, p. 1-6, 1997.
- LIDRAL, A. C. et al. Association of *MSX1* and *TGFB3* with nonsyndromic clefting in humans. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 63, n. 557, p. 557-68, 1998.
- LOFFREDO, L.C.M.; FREITAS, J.A.S.; GRIGOLLI, A.A.G. Prevalência de fissuras orais de 1975 a 1994. **Revista Saúde Pública**, v.35, n.6, 2001.

- MACHIDA, J. et al. Transforming growth factor-alpha (*TGFA*): genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only. **Genomics**, v. 61, n. 3, p. 237-42, 1999.
- MARAZITA, M.L. et al. Non-syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in China: Assessment of Candidate Regions. **Cleft Palate-Craniofac. J.**, v. 39, n. 2, p. 149-56, 2002.
- MARAZITA, M.L. et al. Genome-Scan for Loci Involved in Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Consanguineous Families from Turkey. **Am. J. Med. Genet.**, v. 126A, p.111-22, 2004.
- MARRERO, A.R. et al. Heterogeneity of the Genome Ancestry of Individuals Classified as White in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Am. J. Hum. Biol.**17:496-506, 2005.
- MAZZOTINI, R.; FREITAS, J. A. S.; SILVA FILHO, O. G. A cirurgia ortognática co protocolo de tratamento das fissuras labiopalatais. In.: ARAÚJO, A. Cirurgia Ortognática. São Paulo: Santos, 1999. 374p. p. 309-37.
- MELNICK, M. et al. Genetic analysis of cleft lip with or without cleft palate in Chinese kindreds. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 45, p. 183-90, 1986.
- MITCHELL, L.E. Transforming growth factor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reappraisal. **Genet. Epidemiol.** v. 14, p. 231-40, 1997.
- MITCHELL, L.E. et al. Evaluation of two susceptibility loci for oral clefts in Danish population. **Am. J. Epidemiol.**, v. 153, n. 10, p. 1007-15, 2001.
- MOORE, K.; PERSAUD, T. **Embriologia Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 448p.
- MORENO, L.M. et al. Genetic analysis of candidate loci in non-syndromic cleft lip families from Antioquia-Colombia and Ohio. **Am. J. Med. Genet.**, v. 125A, p. 135-44, 2004.
- PASSARGE, E. *Genética texto e atlas*. Porto Alegre: Artmed ed., 2004. 456p.
- PASSOS-BUENO, M.R. et al. Transforming Growth Factor- α and Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Palate in Brazilian Patients: Results of a Large Case-Control. **Cleft Palate-Craniofac. J.**, v. 41, n. 4, p. 387-91, 2004.
- PEANCHITLERTKAJORN, S. et al. Chromosome 17: gene mapping studies of cleft lip with or without cleft palate in Chinese families. **Cleft Palate-Craniofac. J.** v. 40, n.1, p. 71-79, 2003.
- PRESCOTT, N.J. et al. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in two stage genome scan of affected sib-pairs. **Hum. Genet.**, v. 106, p. 345-50, 2000.

- SATOKATA, I.; MASS, R. MSX1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craneofacial and tooth development. **Nat. Genet.**, v.6, p. 348-56, 1994.
- SCHULTZ, R.E. et al. Targeted scan of fifteen regions for nonsyndromic cleft lip and palate in Filipino families. **Am. J. Med. Genet.**, v. 125A, p. 17-22, 2004.
- SCHUTTE, B.C.; MURRAY, J.C. The many faces and factors of orofacial clefts. **Hum. Molec. Genet.** v. 8, n. 10, p.1853-9, 1999.
- SHAW, G.M. et al. Infant TGF-Alpha Genotype, Orofacial Clefts, and Maternal Periconceptional Multivitamin Use. **Cleft Palate-Craniofac. J.**, v. 35, n. 4, p. 366-70, 1998.
- SHAW, G.M. et al. Maternal vitamin use, infant C677T mutation in MTHFR, and isolated cleft palate risk. **Am. J. Med. Genet.** v. 85, p. 84-5, 1999.
- SHIANG, R. et al. Association of transforming growth factor alpha gene polymorphisms with nonsyndromic cleft palate only. **Am. J. Hum. Genet.** v. 53, p.836-43, 1993.
- SHPRINTZEN, R. J. et al. Anomalies associated with cleft lip, cleft palate, or both. **Am. J. Med. Genet.**, Salt Lake City, UT, v. 20, n. 4, p. 585-95, 1985.
- SLAYTON, R.L. et al. Genetic association studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. **Cleft Palate-Craniofac. J.**, v. 40, n. 3, p. 274-9, 2003.
- STAINER, P.; MOORE, G.E. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. **Hum. Molec. Genet.** v. 13, p. R73-R81, 2004.
- STOLL, C. et al. Genetic variation in *TGFA*: possible association of *BamH I* polymorphism with bilateral sporadic cleft lip and palate. **Am. J. Hum. Genet.** v. 50, p. 870-1, 1993.
- STRACHAN, T.; READ, A. P. **Genética Molecular Humana**. 2.ed, Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. 576p.
- SUAZO, J. et al. Estudio de Asociación por desequilibrio de ligamiento entre los genes *TGFA*, *RARA* y *BCL3* y fisura labiopalatina no sindrómica en la población chilena. **Rev. Med. Chile**, v.133, p. 1051-1058, 2005.
- SUZUKI, Y. et al. In a vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. **Genet. Med.** v. 6, n.3, p. 117-25, 2004.
- TANABE, et al. Analysis of the candidate genes responsible for non-syndromic cleft lip and palate in Japanese people. **Clinical Science** v. 99, p.105-111, 2000.

TOLAROVA, M.M. et al. A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for nonsyndromic cleft lip and palate anomalies. **Am. J. Hum. Genet.** v. 6, n. 4, p. A27, 1998.

VIEIRA, A. R.; ORIOLI, I.M. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, v. 68, n. 4, p. 272-9, 2001.

VIEIRA, A.R., et al. MSX1, PAX9 e *TGFA* Contribute to Tooth Agenesis in Humans. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 9, p. 723-7, 2004.

VIEIRA, A.R., Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. **Am. J. Epidemiol**, v. 22, p. 1-21, 2006.

WYSZYNSKI, M.D.; BEATY, T.H.; MAESTRI, N.E. Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. **Cleft Palate-Craniofac. J.**, v. 33, n. 5, p. 406-17, 1996.

WYSZYNSKI, M.D., et al. Evidence for an association between markers on chromosome 19q and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in two groups of multiplex families. **Hum. Genet.** v. 99, p.22-6, 1997.

ZIEGER, J.S.; BEATY, T.H.; LIANG, H.Y. Oral clefts, maternal smoking, and *TGFA*: a meta-analysis of gene-environment interaction. **Cleft Palate-Craniofac. J.**, v.42, n. 1, p.58-63, Jan. 2005

ZUCCHERO, T.M. et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. **N. Engl. J. Med.** v. 19, p. 351-8, 2004.

www.accessexcellence.org/AB/GG/sky.html

www.forp.usp.br/mef/embriologia/alimentar_respiratorio.htm

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Página 1 de 3.

Título da pesquisa:

Estudo de Alelos do Locus *TGFA* Envolvidos na Etiologia das Fissuras Labiopalatinas em uma Amostra de Pacientes Não-Sindrômicos do Serviço de Defeitos da Face da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Justificativa e objetivos da pesquisa:

Esta pesquisa tem por objetivo estudar algumas características genéticas das pessoas que apresentam alterações no lábio e no palato (céu-da-boca). Essas alterações são chamadas “fissuras labiopalatinas” ou “fendas labiopalatais”.

Cada pessoa tem suas próprias características genéticas. As fissuras labiopalatinas podem acontecer mais facilmente em alguns tipos de pessoas, mais do que em outros, dependendo das características genéticas. Sabe-se que um segmento do nosso material genético, chamado gene *TGFA*, pode estar associado à predisposição de algumas pessoas virem a desenvolver a fissura labiopalatina.

Hoje em dia, estudar este gene e outros segmentos genéticos em pessoas que apresentam fissuras labiopalatinas poderá ser útil para:

- melhorar as estratégias de diagnósticos das fissuras labiopalatinas nas pessoas afetadas;
- oferecer aconselhamento genético para casais com chances de gerar um bebê com fissura labiopalatina;

No futuro, este estudo também poderá contribuir para o tratamento destas alterações da face.

Nesta pesquisa, nós analisaremos o material genético (DNA) dos pacientes que estiverem em atendimento no Centro de Reabilitação de Fenda Labiopalatal da PUCRS e de seus pais. O material genético (DNA) será obtido através de uma amostra de células da bochecha que será coletada durante o atendimento de rotina do paciente ou em visita especial.

Com este DNA, será estudado um segmento genético, chamado gene *TGFA*, de cada pessoa. Após a análise genética, serão comparados os resultados dos pacientes com os dos seus pais ou outras pessoas sem o problema (os controles).

Com este estudo esperamos compreender melhor como as fissuras labiopalatinas ocorrem, se há um componente genético específico para esta característica.

Quando isto for desvendado, a odontologia poderá contar com mais um indicador biológico que auxiliará no diagnóstico e na compreensão do desenvolvimento do lábio e do palato normal e anormal.

Os procedimentos a serem utilizados:

Para realizar este trabalho, vamos recolher uma amostra de células da bochecha de cada participante da pesquisa com uma haste (similar a um “cotonete”).

Os desconfortos ou riscos esperados:

Haverá o possível desconforto da raspagem da bochecha.

Garantia de resposta a qualquer pergunta;

Os participantes da pesquisa devem se sentir à vontade para fazer qualquer pergunta a fim de esclarecer suas dúvidas. Os responsáveis pela pesquisa garantidamente responderão.

 Rubrica do Paciente (ou responsável)

 Rubrica do Pesquisador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Página 2 de 3.

Os benefícios que se pode obter:

Neste momento, o participante da pesquisa não receberá nenhum benefício direto em decorrência deste estudo. Ainda não são bem conhecidos os efeitos que a herança genética tem sobre as pessoas. No entanto, haverá benefícios para a ciência, pois os dados da pesquisa estarão contribuindo na descoberta de indicadores genéticos que auxiliarão futuramente o diagnóstico, a prevenção e o aconselhamento genético das pessoas portadoras ou com risco de ocorrência de fissuras labiopalatinas.

No futuro, caso alguma informação considerada importante seja identificada no material genético analisado em decorrência desta pesquisa, os pesquisadores buscarão o participante da pesquisa (ou familiares) para oferecer-lhe acesso a tal informação.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

Caso o participante da pesquisa tenha vontade de ser retirado da pesquisa, isso poderá ser feito a qualquer momento, sem necessidade de que se apresentem justificativas e sem que se ele sofra qualquer tipo de prejuízo. Unicamente o participante da pesquisa deverá comunicar aos pesquisadores sua decisão de abandonar a pesquisa, retirando-se o consentimento dado.

Compromisso com informação atualizada do estudo;

Toda e qualquer informação atualizada sobre este estudo estará à disposição de todos os participantes. Os resultados deste estudo poderão ser comunicados aos participantes da pesquisa, sempre que solicitados.

Garantia de acompanhamento adequado;

A equipe de profissionais de saúde que atende no Centro de Reabilitação de Fenda Labiopalatal tem uma rotina estabelecida no acompanhamento dos pacientes portadores de fissuras labiopalatinas. Esta rotina de atendimento ao paciente não será alterada em nada por ocasião deste estudo. Assim, garantimos que a concordância ou não na participação deste estudo não implicará em qualquer modificação na rotina do tratamento já estabelecido para os pacientes. Os resultados destes exames não terão efeito algum sobre o participante da pesquisa.

Garantia de Privacidade:

A dignidade e a privacidade do participante da pesquisa, em relação a qualquer dado utilizado nesta pesquisa, serão mantidas. Os dados dos participantes da pesquisa estarão protegidos pelos pesquisadores responsáveis contra qualquer tipo de uso que não os previstos na investigação. Além disto, os dados receberão um número pelo qual serão identificados, garantindo assim, também, o anonimato dos participantes da pesquisa. A identidade o participante da pesquisa será, portanto, totalmente desconhecida pela equipe do trabalho de pesquisa ou por qualquer outra pessoa.

Permissão para uso da amostra de DNA e outros dados em estudos futuros:

A partir da mesma amostra do material genético, poderão ser futuramente estudados outros segmentos de DNA. Para isso, o participante da pesquisa poderá permitir que sua amostra de DNA seja usada em novos estudos. Mesmo que esta permissão seja dada, estudos futuros só poderão ser realizados desde que sejam aprovados antes por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Rubrica do Paciente (ou responsável)

Rubrica do Pesquisador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Página 3 de 3.

Eu, _____ (*preencher com nome ou nome do responsável*) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos do estudo e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A equipe da Dda. Ângela Ehlers Bertoja certificou-me de que todos os dados referentes ao participante desta pesquisa serão confidenciais, bem como o seu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e que, ainda, terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa se assim o desejar. Assim, como responsável pelo paciente _____ (*preencher com nome do paciente, no caso*), dou consentimento para que ele participe da pesquisa.

Paralelamente, () permito que a amostra de material genético seja usada em pesquisas futuras, sem a necessidade de nova consulta, desde que os novos estudos sejam devidamente aprovados por um Comitê de Ética em Pesquisa e estejam sob responsabilidade do mesmo Pesquisador Coordenador. Fui informado que, também nesta situação, caso alguma informação considerada importante seja identificada no material genético analisado em decorrência da pesquisa, os pesquisadores poderão buscar ao participante da pesquisa (ou familiar) para oferecer-lhe acesso a tal informação.

Caso eu tenha novas perguntas sobre este estudo, posso telefonar para Dda. Ângela Ehlers Bertoja no telefone (51) 81515274. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo, ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar também à Dra. Clarice S. Alho nos telefones (51) 9113 6334 ou (51) 3320 3568. As ligações para estes telefones poderão ser realizadas a cobrar.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

		____ / ____ / 20__
Assinatura do participante da pesquisa (ou responsável)	Nome do participante da pesquisa (ou responsável)	Data

		____ / ____ / 20__
Assinatura do Pesquisador	Nome do Paciente	Data

Na impossibilidade de autonomia para a leitura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o mesmo foi lido para _____ (*preencher com nome do participante da pesquisa ou do responsável*) pelo pesquisador _____ (*preencher com nome do pesquisador*) enquanto eu estava presente como testemunha.

		____ / ____ / 20__
Assinatura da Testemunha	Nome da Testemunha	Data

Paciente Nº : _____ Nome: _____
Idade: _____ Gênero: _____ Raça: _____
Responsável: _____ Telefone: _____
Endereço: _____

Anamnese

Parentesco dos pais? _____
Número de cirurgias realizadas: _____
Avaliação cardiológica pré-operatória: _____
Outros afetados na família? _____
Descendência/Raça: _____
Local moradia durante gestação _____

Exame Físico

Aspecto Geral: _____
Crânio e Face: _____
Tipo de Fissura: _____
PC: _____ Orelhas: _____
Diastância Intercantal Interna: _____ Diastância Intercantal Externa: _____
Pescoço: _____
Tórax: _____
Membros Superiores e Inferiores: _____
Manchas: _____
Ausculta Cardíaca: _____
Ausculta Pulmonar: _____
Abdômen: _____
Altura: _____ Peso: _____
Diagnóstico: _____
Observações: _____

ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS

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

Uso de vitaminas (1)S (2) N (3) Não sabe _____

Álcool

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

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

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

Durante que meses bebeu álcool durante a gestação (1) (2) (3) (4) (5) (6) () meses

Quantidade: (1) 1-3 drinks/ mês (2) \geq 4 drinks/mês

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

Durante que meses da gestação fumou _____ meses

Média de cigarros por dia: (1) 1 a 9 cigarros (2) 10 a 20 cigarros (3) > 20 cigarros

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

PN: _____ g Comp _____ cm PC _____ cm Apgar _____

Intercorrências perinatais (1) S (2) N (3) Não sabe _____

HISTÓRICO 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) outros

Antepassados: (1) Europeu Latino (2) Europeu não latino (3) Judeu (4) Nativo

(5) Turco

(6) Negro

(7) Oriental (8) Outros

ANEXO C

EXTRAÇÃO DE DNA DE *SWAB* BUCAL COM NaOH

Material Necessário:

TRIS HCl 1M (pH = 8,0)

Pesar 47,29g de Tris-HCl e dissolver em 100ml de água deionizada (ultra-pura) sob agitação. Completar o volume com água deionizada para 500ml. Ajustar o pH até 8,0 e conservar em geladeira entre 2 – 8°C (validade: 6 meses).

NaOH 50mM

Pesar 1g de NaOH e dissolver em 100ml de água deionizada sob agitação e completar o volume com água deionizada para 500ml. Conservar em temperatura ambiente 20 – 25°C (validade: 6 meses).

Procedimentos:

1. Pipetar 600µl de NaOH 50 mM dentro de um tubo *ependorf* de 1,5ml e cortar a parte do *swab* contendo o material dentro do tubo;
2. Agitar o tubo em alta rotação no vórtex por 5-10 segundos;
3. Incubar a 95°C por 5 minutos;
4. Remover o *swab* cuidadosamente com o auxílio de uma pinça;
5. Agitar o tubo em alta rotação no vórtex por 5-10 segundos;
6. Neutralizar a solução com 60µl de Tris HCl pH 8,0;
7. Agitar o tubo em alta rotação no vórtex por 5-10 segundos;
8. DNA extraído;
9. Conservar o DNA a 0 – 20°C.

APÊNDICE A

EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

(Lahiri &Nurnberger, 1991)

1. Em um tubo de 15ml com tampa acrescentar 5ml de TKM1 e seis gotas de Igepal ou Triton X-100 (o detergente deve ser colocado na parede do tubo para facilitar a dissolução do mesmo);
2. acrescentar a amostra de sangue e mexer bem até formar espuma dentro do tubo;
3. centrifugar 2500 RPM / 10' / TA;
4. descartar o sobrenadante invertendo o tubo (com cuidado para não perder o *pellet* com os núcleos);
5. adicionar ao *pellet* 5ml de TKM1;
6. agitar o tubo até dissolver completamente o *pellet*;
7. repetir passos 3 e 4;
8. adicionar ao *pellet* 800µl de TKM2;
9. agitar o tubo até dissolver completamente o *pellet*;
10. transferir o conteúdo (*pellet*+TKM2) para um tubo de microcentrifuga de 1,5ml;
11. adicionar 50µl de SDS 10% e agitar o tubo até ressuspender e dissolver completamente os núcleos;
12. incubar 65°C / 5';
13. agitar o tubo;
14. incubar 65°C / 10';
15. retirar da incubação e adicionar 300µl de NaCl 6M;
16. misturar invertendo o tubo algumas vezes;
17. centrifugar 13000 RPM / 5' / TA;
18. transferir o sobrenadante para tubos de 1,5ml : 375µl de sobrenadante em três tubos (cuidado para não transferir o precipitado de proteínas!);
19. adicionar 2 volumes de etanol absoluto em cada tubo;
20. incubar a -20°C *overnight*
21. centrifugar 13000 RPM / 20' / TA;
22. descartar o sobrenadante e deixar o *pellet* secar (pode ser em estufa 65°C);
23. ressuspender em 100µl de H₂O Milli-Q;

Reagentes:

TKM1 <ul style="list-style-type: none"> • Tris HCl pH7,6 – 10mM • KCl – 10mM • MgCl₂ – 10mM • EDTA – 2mM 	TKM2 <ul style="list-style-type: none"> • Tris HCl pH7,6 – 10mM • KCl – 10mM • MgCl₂ – 10mM • NaCl – 400mM • EDTA – 2mM 	<ul style="list-style-type: none"> • Igepal ou Triton X-100 • SDS 10% • NaCl 6M • Etanol absoluto gelado • H₂O Milli-Q
--	--	--



EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE CÉLULAS SANGUÍNEAS II

(Eisenberg, A. 1995)

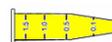


Usar o código de cores de tubos para a manipulação das amostras

Mãe



Filho/Filha



Pai Alegado



1. Misturar bem a amostra de sangue para ressuspender as células;
 2. Remover uma alíquota de 300µl de sangue e colocar em um tubo de 1,5ml devidamente rotulado;
 3. Adicionar 1ml de tampão de lise celular gelado (4°C);
 4. Vortex de 10 a 15 segundos para ressuspender e lisar as células;
 5. Centrifugar as amostras 4000 RPM / 5' para formar o *pellet* de núcleos de leucócitos;
 6. Descartar sobrenadante;
 7. Repetir passos 3-6;
 8. Preparar o mastermix contendo o tampão de digestão de proteína com SDS e proteinase K. Determinar o número total de amostras a serem processadas para o cálculo de volume de mastermix a ser feito. Adicionar 2 ao total de amostras (N+2):
 - a. Tampão de digestão de proteínas com SDS = (N+2) x 395µl
 - b. Proteinase K (20mg/ml) = (N+2) x 5µl
 Misturar tampão de digestão de proteína com SDS e proteinase K;
 9. Adicionar 400µl de mastermix em cada tubo. Pipetar e dispensar a amostra várias vezes para lisar o *pellet* nuclear e passar no vortex por 15 segundos;
 10. Colocar os tubos em banho seco a 55°C;
 11. Incubar as amostras a 55°C por 2 horas. Passar no vortex a cada 30' por 15 segundos para ressuspender o *pellet*.
 12. Após 2 horas de incubação, centrifugar os tubos 13000 RPM / 5' para *pelletar* debrít celular;
 13. Se necessário parar o procedimento, parar neste ponto.
 14. Adicionar 200µl de Cloreto de Lítio 7,5M;
 15. Vortex por 5 segundos e incubar amostras no gelo por 10';
 16. Centrifugar 13000 RPM / 15' para *pelletar* proteínas e outros contaminantes;
 17. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5ml devidamente rotulado;
- EVITAR TRANSFERIR O MATERIAL PRECIPITADO! Descartar o tubo com o *pellet* de proteínas**
18. Adicionar 1ml de etanol 100% em cada tubo, invertendo aproximadamente 50 vezes até um floco de DNA ser visível;
 19. Centrifugar 13000 RPM / 10' para *pelletar* o DNA;

20. Cuidadosamente descartar o sobrenadante de uma só vez e secar o tubo com papel absorvente;
21. Adicionar 1ml de etanol 70% e passar no vortex para dissolver o *pellet* de DNA;
22. Centrifugar 13000 RPM / 5' para precipitar o *pellet* de DNA;
23. Cuidadosamente descartar o etanol 70% de uma só vez e secar o tubo com papel absorvente;
24. Secar as amostras em Speed Vac por 30' ou na bancada até evaporar todo o etanol. O procedimento pode ser parado neste ponto se necessário;
25. Adicionar 250µl de tampão TE estéril;
26. Vortex por 10 segundo e incubar a 55°C por 5' para resuspende o DNA;
27. Retirar da incubação e passar no vortex por 10 segundo para resuspende por completo o *pellet* de DNA;
28. *Spin* de 10 segundos 13000 RPM,
29. Armazenar amostras em -20°C.

Reagentes:

Tampão de lise celular

- Sacarose - 320mM
- Tris-HCl , pH7,5 – 10mM
- MgCl – 5mM
- Triton X-100 – 1%(v/v)

Tampão de digestão de proteínas com SDS

- Tris-HCl , pH7,5 – 10mM
 - EDTA – 10mM
 - NaCl – 10mM
 - SDS – 0,5%
- Acondicionar a TA

Tampão TE⁴

- Tris-HCl , pH7,5 – 10mM
 - EDTA - 0,1mM
- Acondicionar a TA

- Etanol 100%
- Etanol 70%
- Cloreto de Lítio 7,5M
- Proteinase K
20mg/ml



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 23 de fevereiro de 2005.

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0100/04

Intitulado: *Estudo de alelos do locus TGFA envolvidos na etiologia das fissuras labiopalatinas em uma amostra de pacientes não síndrômicos do serviço de defeitos de face da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.*

do(a) aluno(a): *Angela Ehlers Bertoja*

Programa de: *Odontologia*

do curso de: *Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*

Nível: *Doutorado*

Orientado pelo(a): *Profa. Dra. Wanyce M. Robinson*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 21 de janeiro de 2005.

Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

APÊNDICE C



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 188/06-CEP

Porto Alegre, 07 de março de 2006.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 05/02864, intitulado: "Estudo de alelos do locus TGFA envolvidos na etiologia das fissuras labiopalatinas em uma amostra de pacientes não-sindrômicos do Serviço de defeitos da face da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul".

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP. Inicialmente, em 07/09/2006.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Caio Coelho Marques
COORDENADOR EM EXERCÍCIO

Ilmo(a) Sr(a)
Dout Ângela Ehlers Bertoja
N/Universidade

APÊNDICE D

Ministério da Saúde

SISNEP Sistema Nacional de Ética em Pesquisa

REGISTRE SEU PROJETO LISTA DOS COMITÊS FALE CONOSCO CNS CONEP DATASUS

• Projetos Aprovados - RS no ano de 2006

Busca de Projeto de Pesquisa por palavra chave:

Total de Projetos encontrados: 1

CAAE	Título do Projeto	Instituição Sediadora
1480.0.002.265-05	Estudo de Alelos do Locus TGFA Envolvidos na Etiologia das Fissuras Labiopalatinas em uma Amostra de Pacientes Não-Sindrômicos do Serviço de Defeitos da Face da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

[Voltar](#)