



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

Bruna Cláudia Meireles Khayat

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES METABOLIZADORES DE
XENOBIÓTICOS EM PACIENTES COM FISSURA LABIOPALATINA
ATENDIDOS NO ESTADO DO PARÁ**

Belém – Pará

Dezembro de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

Bruna Cláudia Meireles Khayat

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES METABOLIZADORES DE
XENOBIÓTICOS EM PACIENTES COM FISSURA LABIOPALATINA
ATENDIDOS NO ESTADO DO PARÁ**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Burbano.

Co ordenador: Andre Salim Khayat

Belém – Pará

Dezembro de 2013

KHAYAT, B C M

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES METABOLIZADORES DE XENOBIÓTICOS EM PACIENTES COM FISSURA LABIOPALATINA ATENDIDOS NO ESTADO DO PARÁ.

Bruna Cláudia Meireles Khayat- Belém-Pará-2013

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano

Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Celular.

Código de Catalogação:

Bruna Cláudia Meireles Khayat

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES METABOLIZADORES DE
XENOBIÓTICOS EM PACIENTES COM FISSURA LABIOPALATINA
ATENDIDOS NO ESTADO DO PARÁ**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Burbano.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rommel Mário Rodrigues Burbano
Professor da Universidade Federal do Pará (UFPA)
Orientador

Dra Caroline Aquino Moreira Nunes. (Hemopa-UFPA)

Dra. Ana Paula Araújo Guimaraes (UEPA) Externa

Dr. Jefferson José Sodré Ferraz (Cesupa) Externo

Dedico esta Tese,

Aos meus filhos Hannah e Tarek, pelos momentos ausentes durante estes quatro anos, onde principalmente o Tarek(5anos) cresceu ouvindo a mamãe falar, que tinha que estudar muito para ser Doutora.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter proporcionado esse momento único em minha vida;

À minha família, por ter dado o suporte e entendido os momentos de ausência;

Ao meu orientador Prof.Dr Rommel Burbanno, por todo apoio e dedicação no decorrer desta tese;

Ao Prof. Dr Ney Santos, pelo auxílio e apoio durante os experimentos;

Agradeço a todos os alunos que me auxiliaram no início, meio e principalmente no fim desta tese, e mostraram que a união faz a força;

A todos os pacientes do Hospital Ophir Loyola, que fizeram parte deste estudo;

Ao meu marido e co-orientador Prof. Dr. André Salim Khayat, que é um dos principais culpados de eu estar finalizando esta fase da minha vida.

FONTES FINANCIADORAS E INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa-FAPESPA

Universidade Federal do Pará – UFPA

Hospital Ophir Loyola-HOL

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

RESUMO

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES METABOLIZADORES DE XENOBIÓTICOS EM PACIENTES COM FISSURA LABIOPALATINA ATENDIDOS NO ESTADO DO PARÁ

Fissura lábio palatina ou orofaciais é um dos mais frequentes defeitos congênitos existentes e vários estudos relacionam essa malformação a causas multifatoriais. Entre as diversas causas ambientais estão os hábitos etílicos e tabagistas maternos, assim como o uso de agrotóxico. A resposta do embrião humano a agentes teratogênicos é bem conhecida. Porém, sabe-se que organismos diferentes metabolizam de maneira distinta um mesmo componente químico, isto se deve a características genéticas intrínsecas relacionadas a diferentes funcionamentos enzimáticos. Tais diferenças podem ser investigadas a partir da análise de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo destes xenobióticos, que podem assim estar relacionados à etiogênese de fissuras lábio palatinas. O Objetivo do nosso estudo foi analisar polimorfismos em sete genes, **PON1** (rs662), **PON1** (rs854560), **MTHFD1**, **CYP2E1**, **EPHX1**, **ABCB1**, **AHR**, onde uma análise correlativa com fatores ambientais, como exposição a agrotóxicos foi realizada, a fim de avaliar se existe ou não influência das diferentes variantes polimórficas e tais interações ambientais na etiogênese das fissuras lábio palatinas.

O número total de amostras analisadas foi de 166 indivíduos, sendo 83 pacientes acometidos por fissura, com idade média de 7 anos (DP 5 anos) e 83 mães dos mesmos. Em nossas amostras, o gênero masculino foi 64% do total de acometidos.; uma ficha para a coleta de dados epidemiológicos foi desenvolvida para o estudo; o material biológico coletado para análise foi sangue. A análise estatística foi realizada com os *softwares bioEstat 5.3, SPSS 12.0 e PLINK 1.07*. Nosso resultado consiste de quatro análises diferentes, para cada polimorfismo. Inicialmente, observamos as diferenças entre as frequências genótípicas encontradas nos acometidos e nas mães destes e aquelas das populações de indivíduos hígidos. Isto visando encontrar diferenças entre estes genótipos que possam justificar a gênese das FLP, frente à exposição das mães, e intrauterinamente, dos filhos ao agrotóxico.

Num segundo momento, verificamos se houveram diferenças entre os genótipos maternos e dos acometidos, que pudessem representar diferenças significativas entre estes dois grupos de indivíduos (pois as mães, independentemente da exposição ao agrotóxico,

poderiam ter FLP, caso o genótipo fosse de elevada importância) e que possam ter relação com a FLP.

Em uma terceira análise, observamos se os genótipos encontrados nos indivíduos que apresentam FLP, estão relacionados à exposição relatada aos agrotóxicos, como fator etiológico destas más formações.

Em última análise, visamos, por análise de regressão, verificar se a característica genotípica desses alvos de estudo, possa ter influenciado no fenótipo do tipo de fissura, seja somente labial, seja palatal ou labiopalatal.

A distribuição dos tipos de fissuras entre os acometidos foi de 12% para fissuras somente labiais, 19% para fissuras somente palatais e 69% das fissuras em nosso grupo amostral atingiam o lábio e o palato.

Palavras Chaves: Fissuras Orofaciais, Genética, Polimorfismo, Agrotóxico.

ABSTRACT

XENOBIOTIC METABOLISING GENE POLYMORPHISMS EVALUATION IN ORAL CLEFT PATIENTS TREATED IN PARÁ STATE.

Orofacial cleft palate or lip is one of the most common birth defects and several existing studies that relate to multifactorial causes malformation. Among the various environmental causes are the ethyl and maternal smoking habits , as well as the use of pesticides. The response of human embryo teratogenic agents is well known. However , it is known that different organisms metabolize differently the same chemical component , this is due to intrinsic genetic characteristics related to different enzymatic runs . Such differences can be investigated from the analysis of polymorphisms in genes related to metabolism of these xenobiotics , which may well be related to etiogênese palatine cleft lip . The objective of our study was to analyze polymorphisms in seven genes , PON1 (rs662) , PON1 (rs854560) , MTHFD1 , CYP2E1 , EPHX1 , ABCB1 , AHR , where a correlative analysis with environmental factors such as exposure to pesticides was performed in order to assess whether there is influence of different polymorphic variants and environmental interactions in such etiogênese of cleft Lip and Palate .

The total number of samples analyzed were 166 subjects, 83 patients affected by cleft , with an average age of 7 years (SD 5 years) and 83 mothers of the same . In our samples , the males was 64 % of the total affected. A plug for the collection of epidemiological data was developed for the study , the biological material collected for analysis was blood. Statistical analysis was performed using the BioStat 5.3, SPSS 12.0 software and plink 1:07 . Our result is four different analyzes for each polymorphism. Initially, we observed differences between genotypic frequencies found in affected and mothers of these populations and those of healthy individuals . This aimed to find differences among genotypes that may justify the genesis of FLP , after exposure of mothers and intrauterinamente of the children to pesticides .

Secondly, we looked at whether there were differences between the affected and maternal genotypes , which could represent significant differences between these two groups of individuals (as the mothers , regardless of exposure to pesticides could have FLP if the genotype was of high importance) and which may be related to the FLP .

In a third analysis, we observed that the genotypes found in individuals with FLP , are related to the reported pesticide exposure as an etiological factor of these malformations .

Ultimately, we aim , through regression analysis to determine whether the genotypic characteristics of these targets of study , may have influenced the phenotype of the type of cleft , lip only be either palate or cleft lip .

The distribution of types of cracks between affected was 12% only for chapped lips, only 19% to 69% palate and the cracks in our sample group reached the lip and palate.

Keys words: Orofacial clefts, Genetic Polymorphism, Pesticides:

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT- Comunicação de Acidente do Trabalho

FLP- Fissura Labiopalatina

HOL- Hospital Ophir Loyola

LLA- Leucemia Linfoblástica Aguda

NCBI- Center for Biotechnology Information

OMS- Organização Mundial da Saúde

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

SAP- Shrimp alkaline phosphatase

SIH- Sistema de Internação Hospitalar

SIM- Sistema de Mortalidade

SINAN- Sistema Nacional de Informação de Agravos Notificáveis

SINDAG- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola

SINITOX- Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica

SNP- Polimorfismo de Nucleotídeo Único

TCDD- 2,3,7,8-tóxico persistente tetracholordibenzo-p-dioxina

SUMÁRIO	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Fissura Labiopalatina	19
2.1.1 Embriologia	19
2.1.2 Classificação das Fissuras Labiopalatinas	20
2.1.3 Epidemiologia das Fissuras	21
2.1.4 Etiologia das Fissuras	23
2.2 Agrotóxico e a Saúde Humana	24
2.3 Fatores Genéticos e Metabolismo dos Genes Candidatos	28
2.4 Genes Envolvidos no Metabolismo de Agrotóxico	29
2.4.1 <i>CYP2E1</i>	29
2.4.2 Gene <i>ABCB1</i>	30
2.4.3 Gene <i>AHR</i>	31
2.4.4 Gene <i>EPHX1</i>	33
2.4.5 Gene <i>PON1</i>	34
2.4.6 Gene <i>MTHFD1</i>	35
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo Geral	36
4.2 Objetivos Específicos	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 Amostra	36
5.2 Extração de DNA	37
5.3 Seleção de Ensaio	38
5.4 Reação em Cadeia da Polimerase	38
5.5 SnaPshot	39
5.6 Aspectos Éticos	40
6 ANÁLISE DOS DADOS	40
7 RESULTADOS	40
8 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	43

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	64
ANEXO 1: Documentação de Aprovação do Comitê De Ética Em Pesquisa	65
ANEXO 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	66
ANEXO 3: Ficha de Coleta de Dados de Pacientes com Fl/P Atendidos No Hospital Ophir Loyola, Belém/Pará	67

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população humana e de suas atividades associadas à agricultura, comércio, industrialização contribuem para a depredação da biodiversidade e variabilidade genética. Na década de 40 se descobriu que certos contaminantes ambientais eram responsáveis pela redução da fertilidade na vida selvagem, e que o fim de muitas populações naturais era explicado pela exposição à xenobióticos. As respostas à xenobióticos incluem efeitos farmacológicos, toxicológicos, imunológicos, carcinogênicos e teratogênicos (Pessoa *et al.*, 2003)

Entre estes efeitos, temos o defeito congênito, que é qualquer anomalia anatômica, metabólica ou funcional, herdada por um mecanismo de transmissão mendeliana, ou causada por uma mutação gênica nova, por uma alteração cromossômica ou por uma agressão física, química ou infecciosa sobre o feto ou embrião em desenvolvimento. Suas causas podem ser genéticas ou ambientais, sendo, na maioria das vezes, de origem multifatorial, onde fatores de predisposição genética interagem com fatores ambientais desencadeadores. (Castilla *et al.*,1996).

A utilização de agrotóxicos representa risco ambiental de grande magnitude e com elevado custo econômico. Além de contaminar o ar, o solo, as águas superficiais e subterrâneas, causam graves danos à saúde, tanto dos trabalhadores que manipulam os produtos químicos como dos consumidores de alimentos contaminados com resíduos de substâncias tóxicas (Poltroniéri, 1997).

A contaminação das águas superficiais e subterrâneas em áreas com aplicação de agrotóxicos ocorre principalmente através dos processos de escoamento e lixiviação, afetados pela sorção, processo que vem recebendo muita atenção de pesquisadores nas últimas décadas. A sorção é influenciada pelas propriedades do agrotóxico e do solo (Silva, 1994; Singh, 2002), destacando-se a mineralogia e os teores de argila e de matéria orgânica (Vieira *et al.*, 1999; Lopes *et al.*, 2002; Spark & Swift, 2002).

O Brasil é um dos países líderes no uso de agrotóxicos, assim como no número de trabalhadores expostos a estes pesticidas que incluem uma numerosa e diversificada gama de produtos com diferentes composições. Os agrotóxicos estão entre os mais importantes fatores de risco para a saúde dos trabalhadores e para o meio ambiente. Utilizados em grande escala por vários

setores produtivos e mais intensamente pelo setor agropecuário, são ainda utilizados na construção e manutenção de estradas, tratamentos de madeiras para construção, indústria moveleira, armazenamento de grãos e sementes, produção de flores, combate às endemias e epidemias, como domissanitários etc. Enfim, os usos desses produtos excedem em muito aquilo que comumente se reconhece. (Faria *et al.*, 2007)

Segundo Meirelles (2005), a avaliação e análise das condições de exposição aos produtos químicos em geral, e aos agrotóxicos em particular, representam um grande desafio aos estudiosos da relação saúde/trabalho/exposição a substâncias químicas. Um dos principais aspectos dificultadores da avaliação da exposição e dos efeitos sobre a saúde humana causados pelos produtos em questão, diz respeito ao número de substâncias e produtos que estão agrupados sob o termo agrotóxico. Ou seja, quando se discute os efeitos à saúde humana causados pelos agrotóxicos, não está se referindo a uma única substância, mas a milhares delas.

A utilização destes agrotóxicos, sem os cuidados básicos para a proteção dos trabalhadores, leva a uma série de efeitos adversos a saúde humana, que incluem doenças degenerativas e câncer (Purdue *et al.*, 2007), assim como efeitos nocivos sobre os sistemas imune, hematológico, nervoso, endócrino e reprodutivo (Mourad, 2005). Tais compostos são também associados a alterações no material genético, que se expressam basicamente como alterações cromossômicas numéricas e estruturais (Zeljezic e Garaj – Vrbovac, 2001)

Desde a década de 40 o uso de herbicidas, inseticidas e fungicidas vem aumentando dramaticamente na agricultura. Estas substâncias são sabidamente produzidas para serem tóxicas para determinados organismos, mas em contrapartida são suspeitas de serem teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas em animais, porém, pouca atenção é dispensada às suas inúmeras formulações e seus efeitos sobre a saúde da população. Diante deste fato Gordon & Sky (1981) levantaram a hipótese de que a exposição intrauterina a estes agentes em áreas de plantio e em períodos de pico em sua utilização, principalmente no primeiro trimestre, poderia estar associada a um aumento no risco de defeitos congênitos. Considerou-se como exposição o trabalho materno na agricultura, a residência em áreas de plantio e a atividade com jardinagem por parte da mãe. Como em todo estudo ecológico, não é possível generalizar os dados, mas os efeitos desta exposição na ocorrência das fissuras são demonstráveis.

Vários estudos mostram que o polimorfismo genético de enzimas que metabolizam xenobióticos são um importante fator de suscetibilidade individual para câncer e outras doenças, inclusive más formações congênitas (Rossit *et al.*, 1999).

Vale ressaltar que, boa parte da população do norte do Brasil é rural e sua principal atividade de trabalho envolve a utilização de agrotóxicos, isto nos faz perceber a importância de investigar características genéticas que possam influenciar no biometabolismo destes compostos e assim, procurar elucidar que variantes polimórficas possam estar envolvidas em mecanismos de teratogênese, mais especificamente na gênese de fissuras labiopalatais. (Faria *et al.*, 2007)

Com os recentes avanços da biologia molecular, novos métodos vêm sendo incorporados ao estudo da etiologia de diferentes patologias, possibilitando inclusive, sua inclusão na prática clínica para testes de diagnósticos. Neste aspecto, a disponibilidade de empresas de biotecnologia capazes de oferecer insumos e equipamentos aumentou consideravelmente, facilitando a atuação dos cientistas e barateando os diferentes métodos, tornando-os mais acessíveis. Essa situação se aplica ao estudo dos polimorfismos de genes que, ainda a um custo relativamente alto, permite investigar se pequenas mutações locais de um determinado gene estão associados ou não a uma patologia.

Os polimorfismos dos genes são formas variantes da sequência de DNA, que podem estar presentes nos indivíduos de uma mesma população dentro de um espectro biologicamente normal (Kornman *et al.*, 2007). Referem-se à existência de dois ou mais alelos em um dado *locus*, com uma frequência alélica maior do que 1% na população.

Estas variações são responsáveis pela diversidade humana e podem atuar como marcadores genéticos, na investigação e diagnósticos de patologias. (Parliament & Murray, 2010).

Frente a estas informações, decidimos avaliar a hipótese de que polimorfismos nos genes, **PONIRS662**, **PONIRS854560**, **CYP2E1**, **AHR**, **MTHFD1**, **EPHX1**, **ABCB1**, possam estar associados ao biometabolismo de xenobióticos e de fatores relacionados a fissuras labiopalatinas.

Mas qual seria a função destes genes nesse processo? Primeiramente, todo gene é capaz de codificar um transcrito (mRNA) capaz de, nos ribossomos, ser traduzido em uma proteína

específica. Uma proteína “simplesmente” traduzida não garante sua função no metabolismo celular, necessitando de modificações pós-traducionais, as quais, na maioria dos casos, são decisivas para a perfeita atividade destas proteínas e sua contextualização na célula (Carinci *et al.*, 2007, Kohli & Kohli .2012)

De um modo geral, pequenas variações estruturais afetam sua configuração tridimensional, podendo levar à inativação da proteína ou a uma diminuição drástica em sua atividade. Assim, Polimorfismos genéticos poderão afetar, de forma direta, a atividade destas proteínas codificadas (Cobourne *et al.*, 2004).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISSURAS LABIOPALATINAS

2.1.1 EMBRIOLOGIA

A classificação das fissuras é baseada no desenvolvimento embriológico e é definida por sua causa e desenvolvimento físico. A categoria de causas inclui: fissuras labiais e/ou palatinas síndrômicas e não-síndrômicas, onde as não-síndrômicas são caracterizadas pela ausência de qualquer anomalia física ou de desenvolvimento, exceto a presença de fissura (Schutte & Murray, 1999). Os casos síndrômicos podem estar associados a síndromes cromossômicas, desordens Mendelianas, teratógenos e outras síndromes não categorizadas (Murray, 2002).

Em relação aos desenvolvimentos labiais, alveolares e palatais, todos tem seu fechamento entre a 4ª e 10ª semana de gestação (Murray, 2002). O lábio começa seu desenvolvimento no início da quarta semana, sendo formada pela fusão dos processos faciais que servem como limites externos para o fechamento da cavidade oral. Os lábios são resultados de uma estrutura em mosaico formada pelos processos frontonasal, maxilar esquerdo e direito e mandibular esquerdo e direito (Lettieri, 1983). O desenvolvimento do palato começa durante a quinta semana de gestação, depois da fusão do lábio superior e se completa no final da décima segunda semana. A formação do palato segue o desenvolvimento inicial da região oral, sendo dividido em duas regiões — o palato primário e o palato secundário (Gorlin *et al.*,2001). No início da sexta semana, o palato primário começa a desenvolver-se formando a parte pré-maxilar da maxila. Ele representa apenas uma pequena parte do palato duro adulto. O palato secundário também começa a se desenvolver no início da sexta

semana, dando forma ao primórdio das partes duras e moles do palato. O palato secundário se funde com o septo nasal e a parte posterior do palato primário. Gradativamente, desenvolve-se osso no palato primário, formando a parte pré-maxilar da maxila que alojará os dentes incisivos.

Concomitante, o osso avança do palato para os processos palatinos laterais para formar o palato duro. As partes posteriores destes processos não são ossificadas e formarão o palato mole e a úvula (Moore & Persaud, 2000).

A base embriológica da fissura palatina é a falta do encontro e a fusão das massas mesênquimais dos processos palatinos laterais entre si, com o septo nasal e/ou com a margem posterior do processo palatino mediano. (Gorlin *et al.*,2001)

2.1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS FISSURAS LABIOPALATINAS.

A natureza das fissuras labiopalatinas decorre da falta de coalescência dos processos maxilares, mandibulares e frontonasal no período embrionário ou no início do período fetal, considerando-se que a palatogênese começa no final da quinta semana e se completa somente na 12ª semana do desenvolvimento fetal, sendo o período mais crítico para a ocorrência de malformações de palato o que vai da sexta até o início da nona semana (Moore e Persaud, 2000).

Muitas foram as tentativas de classificação de fissuras ao longo dos anos, atualmente, a mais utilizada no Brasil é a formulada por Spina *et al.*(1972) que propuseram uma classificação em quatro categorias, tomando como ponto de reparo o forame incisivo, limite entre o palato primário e o secundário. Assim, as fissuras são classificadas em: fissura pré-forame incisivo, que são exclusivamente labiais, sendo originárias embriologicamente do palato primário; fissura pós-forame incisivo, que são fendas palatinas, em geral medianas, que podem situar-se apenas na úvula, palato primário ou envolver o palato secundário; fissura transforame incisivo, de maior gravidade, envolvendo estruturas anatômicas oriundas dos palatos primário e secundário e fissuras raras da face, que são as fissuras oblíquas do lábio, nariz, ou mesmo de toda a face. (Tabela 1) e (Figura 1).

Tabela 1 - Classificação dos tipos de fissura labiopalatina.

Spina et al. (1979)	Fissuras pré-forame Incisivo	São as fissuras labiais unilateral, bilateral e mediana
	Fissuras transforame incisivo	São as de maior gravidade, unilaterais ou bilaterais, atingindo lábio, arcada alveolar e todo palato
	Fissuras pós-forame incisivo	São fissuras palatinas, em geral medianas, que podem situar-se apenas na úvula, ou nas demais partes do palato duro e mole

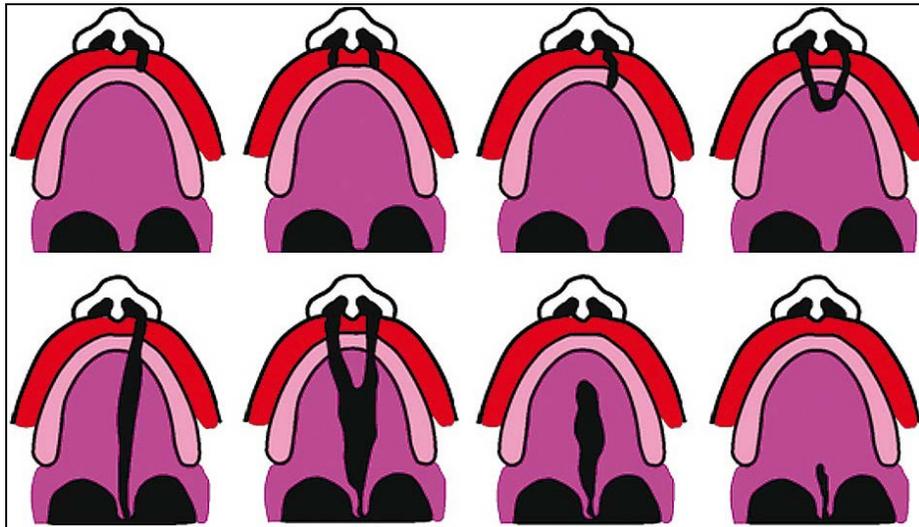


Figura 1 – As malformações labiopalatinas estão representadas da esquerda para direita e de cima para baixo nesta ordem: fissura pré-forame unilateral incompleta, fissura pré-forame bilateral incompleta, fissura pré-forame unilateral completa, fissura pré-forame completa bilateral, fissura transforame unilateral, fissura transforame bilateral, fissura pós-forame completa e fissura pós-forame incompleta.

2.1.3 EPIDEMIOLOGIA DAS FISSURAS

Os primeiros relatos de casos de fissura labial remontam ao século I da Era Cristã. Ao longo dos tempos, houve várias tentativas de descrever a etiologia deste tipo de má-formação, embora o real progresso do conhecimento das lesões, dos distúrbios e dos procedimentos terapêuticos somente aconteceu nos últimos 50 anos (Lofiego, 1992). Hoje, sabe-se que entre as anomalias

congênitas da face, as fissuras labiopalatinas, também conhecidas como lábio leporino ou goela de lobo, são as mais comuns, cuja incidência pode variar entre 1: 300 a 1: 2500 nascidos vivos (Wyszynski *et al.*, 1996). A incidência varia de acordo com a localização geográfica, etnia e condições socioeconômicas da população estudada (Murray, 2002; Skare *et al.*, 2012).

A incidência de Fissuras Labiopalatinas encontra-se elevada em parte da América Latina e Ásia (China, Japão) e baixa em Israel, África do Sul e Sul da Europa, enquanto que a incidência de fissura palatina é elevada no Canadá e em partes do norte da Europa e baixas em partes da América Latina e África do Sul (Cooper *et al.*, 2000; Nagase *et al.*, 2010)

De acordo com a literatura internacional, a incidência em índios americanos é de 3,6: 1000, em japoneses é de 2, 1:1000, em chineses 1,4: 1000 em caucasianos 0,7-1,3: 1000 e entre negros é de 0,3: 1000 nascidos vivos (Natsume, 1987; Wyszynski *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 2000)

No Brasil, estima-se que a cada 700 recém-nascidos um seja portador de fissura (Menegotto e Salzano, 1991).

As fissuras labiopalatinas são uma das mais frequentes anomalias congênitas orofaciais. Essas malformações acometem o terço médio da face, sendo ocasionadas pela não fusão dos ossos maxilares, durante a sexta e a décima semana de vida intra-uterina.(Carreirão, *et al.* 1996)

Podem ser um achado isolado ou ocorrer em associação com outros distúrbios, como um componente de uma síndrome (Gorlin *et al.*, 2001)

Estudos epidemiológicos têm sido realizados em todo o mundo, e têm mostrado que a prevalência de fissuras labiopalatinas varia muito em relação aos países, sendo de apenas 1,07%, no Japão, e de 4,3%, em Taiwan.

No Brasil segundo (Souza *et al.*, 1987), a prevalência varia de 0,47 e 1,54 a cada 1.000 nascidos vivos.

No Pará, segundo HOL, 2009, a distribuição de casos registrados encontra-se distribuídos nas seguintes regiões: 20% dos casos na Região Metropolitana, 15% Alto Marajó, 6% Barcarena, 5% Cametá e 54% Outras regiões.

2.1.4. ETIOLOGIA DAS FISSURAS

A etiologia da fissuras lábio palatinas é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais (Murray, 1995; Vieira 2003). Estudos relacionados a exposições ambientais são importantes à medida que sugerem que interrupções em determinadas vias metabólicas podem desempenhar um papel no desenvolvimento das fissuras labiopalatinas (Murray, 2002; Boyles *et al.*, 2006; Erickson, 2010; Skare *et al.*, 2012).

A etiologia das más-formações faciais ainda é desconhecida, no entanto, de acordo com Nussbaum (2001) e Moore e Persaud (2004) existem evidências que fatores genéticos e ambientais atuam em associação na origem das fendas labiopalatinas. Agentes teratogênicos podem aumentar o risco de uma mãe conceber um filho com fissura labiopalatina quando exposta nos primeiros meses de gravidez. Fendas labiais e/ou palatinas podem ser causadas pela ingestão materna de drogas anticonvulsivantes durante a gestação (Hanson, 1980), bem como devido à prática de tabagismo (Saxen e Lathe, 1974).

Dentre os fatores ambientais que parecem estar envolvidos com fissuras lábio palatinas, destacam-se: uso de medicamentos (Blied *et al.*, 2009; Zarante *et al.*, 2009), exposição aos agrotóxicos (Garcia *et al.*, 1999), exposição ocupacional (Lorente *et al.*, 2000; Desrosiers *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012), altitude (Castilla *et al.*, 1999; Poletta *et al.*, 2007), consumo de álcool (Baker *et al.*, 1998; Lorente *et al.*, 2000; Sokol *et al.*, 2003; Leite & Koifman, 2009), o tabagismo (Chung *et al.*, 2000; Little *et al.*, 2004; Vardavas *et al.*, 2008; Leite & Koifman, 2009), a presença do diabetes mellitus (Beard, 1982; Spilson *et al.*, 2001) e a deficiência nutricional de ácido fólico (Shaw *et al.*, 1995; Czeizel *et al.*, 1999; Itikala *et al.*, 2001; Boyles *et al.*, 2006; Blied *et al.*, 2012; Houston, 2012; Kelly *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012) durante o período gestacional.

Em função do contato direto com agrotóxicos, Garcia *et al.*, (1999) reportaram que as mães que estavam envolvidas em atividades agrícolas entre o primeiro trimestre da gravidez e o mês anterior a concepção, tiveram um forte aumento no risco de terem bebês portadores de defeitos do sistema nervoso, fissuras labiopalatinas e anomalias múltiplas.

2.2 AGROTÓXICO E A SAÚDE HUMANA

Desde os mais primórdios tempos existe consciência humana sobre as condições ambientais e sua relação com a saúde. As relações entre os movimentos da natureza (Clima, Fases da Lua, Chuvas, Ventos) e as enfermidades, sempre estiveram presentes nas cosmologias primitivas e são relatadas desde a Antiguidade por filósofos e sábios orientais e ocidentais. Essa preocupação se acentuou na modernidade, particularmente nos séculos XVIII e XVI, quando se intensificou no ocidente o processo de industrialização e de urbanização e os problemas ambientais, visivelmente começaram a ser associados à saúde, às condições de vida e de trabalho.

Os agrotóxicos estão entre os mais importantes fatores de risco para a saúde dos trabalhadores e para o meio ambiente. Utilizados em grande escala por vários setores produtivos e mais intensamente pelo setor agropecuário, são ainda utilizados na construção e manutenção de estradas, tratamentos de madeiras para construção, indústria moveleira, armazenamento de grãos e sementes, produção de flores, combate às endemias e epidemias, como domissanitários etc. Enfim, os usos desses produtos excedem em muito aquilo que comumente se reconhece (Silva *et al*, 2005).

Dentre os trabalhadores expostos destacam-se, além dos trabalhadores rurais, os da saúde pública, de empresas desinsetizadoras, de transporte, comércio e indústria de síntese. Ressalte-se ainda, que a população em geral também está exposta, seja através de resíduos em alimentos, de contaminação ambiental ou acidental. Os gastos mundiais com agrotóxicos crescem continuamente, passaram de US\$ 20 bilhões em 1983 para US\$ 34,1 bilhões ao longo dos anos 90. A América latina é a região onde mais cresceram as vendas. No Brasil, foi observado importante aumento de vendas nos anos 90 passando de 1,0 bilhão de dólares em 1990, para 2,18 bilhões de dólares em 1997(Brasil, 1999)

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola (SINDAG), em 2001, o Brasil foi o oitavo país consumidor destes produtos, com 3,2 kg/ha de agrotóxicos. À sua frente estavam Holanda, Bélgica, Itália, Grécia, Alemanha, França e Reino Unido.

A avaliação e análise das condições de exposição aos produtos químicos em geral, e aos agrotóxicos em particular, representam um grande desafio aos estudiosos da relação saúde/trabalho/exposição a substâncias químicas. Um dos principais aspectos dificultadores da avaliação da exposição e dos efeitos sobre a saúde humana causados pelos produtos em questão, diz

respeito ao número de substâncias e produtos que estão agrupados sob o termo agrotóxico. Ou seja, quando se discute os efeitos à saúde humana causados pelos agrotóxicos, não se está se referindo a uma única substância, mas a milhares delas.

Só no Brasil, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estão disponibilizadas pouco mais de 500 monografias de ingredientes ativos de agrotóxicos, domissanitários, produtos não agrícolas e preservante de madeira cujo uso encontra-se autorizado no Brasil. No mesmo endereço eletrônico encontra-se ainda, a relação dos ingredientes ativos que, atualmente, não possuem autorização de uso no Brasil. Porém, não pode ser esquecido que em algum momento estas substâncias foram registradas no órgão competente e tiveram seu uso aprovado. Portanto, populações estiveram expostas. É importante registrar que o contrabando possibilita a entrada de produtos já proibidos ou mesmo nunca aprovados no Brasil, aumentando assim, os riscos das populações expostas (Brasil, 2004).

De acordo com o SINDAG, em 2003, existiam no Brasil 648 produtos em linha de comercialização, sendo os principais comercializados: inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas e demais grupos químicos (Tabela 2).

Tabela 2: Principais Agrotóxicos de Importância em Saúde Pública

Inseticidas: Organofosforados, Organoclorados, Piretróides

Fungicidas: Ditiocarbamatos

Herbicidas: Fenoxiacéticos, Dipiridílicos

Fumigantes: Brometo de Metila e Fosfeto de Alumínio

Fonte: Sindag, 2003

Segundo Meirelles (2005), atualmente existem no Brasil, 470 ingredientes ativos de agrotóxicos, 572 produtos técnicos e 1.079 produtos formulados no mercado nacional, sendo 45% de herbicidas, 27% de inseticidas e 28% de fungicidas.

Todo o debate sobre saúde e ambiente, parte de dois pressupostos básicos: o primeiro é a essencialidade da relação entre os seres humanos e a natureza. O segundo, derivado dessa relação, é de que o conceito de ambiente, tal como o entendemos é construído pela ação humana. Dessa forma ele é histórico e pode ser pensado, repensado, criado e recriado tendo em vista nossa

responsabilidade presente e futura com a existência, as condições e a qualidade da vida dos indivíduos e em sociedade e de toda a biosfera (Solomon, 2000).

Os agrotóxicos são agentes químicos que determinam uma série de efeitos nocivos à saúde humana. De acordo com a classe química a que esses produtos pertencem e o tipo de exposição, podem causar desde dermatites até alguns tipos de cânceres. De acordo com o Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas (SINITOX), dentre os 530 óbitos registrados pelos Centros de Controle de Intoxicações em 2003, os principais agentes tóxicos envolvidos foram os agrotóxicos de uso agrícola, correspondendo a mais de 30% das causas do total de óbitos. Para o sexo masculino, esses agentes químicos representaram aproximadamente 40% do total de óbitos registrados.

Os inseticidas da classe dos organofosforados, bem como os carbamatos, atuam no organismo humano inibindo uma enzima denominada acetilcolinesterase. Essa enzima atua na degradação da acetilcolina, um neurotransmissor responsável pela transmissão dos impulsos no sistema nervoso (central e periférico). Uma vez inibida, essa enzima não consegue degradar a acetilcolina, ocasionando um distúrbio chamado de “crise colinérgica”, principal responsável pelos sintomas observados nos eventos de intoxicação aguda por esses produtos. Vários distúrbios do sistema nervoso foram associados à exposição aos agrotóxicos organofosforados, principalmente aqueles ligados à neurotoxicidade destes produtos, observados através de efeitos neurológicos retardados. (Silva *et al*, 2005)

Em um estudo realizado em uma comunidade agrícola do Município de Nova Friburgo, foi observado que 30% dos trabalhadores desta comunidade apresentavam um quadro de polineuropatia periférica e alterações comportamentais que remetem a distúrbios do sistema nervoso central. A análise estatística demonstrou que a média de atividade de acetilcolinesterase do grupo que apresentava fasciculação foi significativamente inferior (decorrente de sua inibição) em relação ao grupo que não apresentava este sinal, demonstrando a relação direta entre a exposição a este grupo de agentes agrotóxicos e o desenvolvimento de doenças do sistema nervoso central. Esse mesmo estudo mostrou que 20% das crianças da localidade apresentavam atividade colinesterásica diminuída, indicando sua exposição a agrotóxicos. Muitas dessas crianças diziam não trabalhar diretamente na lavoura, se referindo apenas a uma “ajuda” aos pais e, nesta condição, muitas vezes,

estavam mais expostas por se protegerem inadequadamente, já que na sua percepção não iriam sofrer uma exposição direta (Silva *et al*, 2005).

Os inseticidas da classe dos organoclorados são agentes químicos que têm a capacidade de se acumular nas células gordurosas do organismo humano e de outros animais, o que pode vir a determinar uma série de efeitos indesejados à saúde. Além disso, os organoclorados são muito estáveis e podem persistir nos organismos e no ambiente por mais de trinta anos. Apesar de proibidos há mais de vinte anos, alguns agentes organoclorados, como o DDT, ainda são utilizados na agricultura, inclusive na região serrana do Estado do Rio de Janeiro, frutos de contrabando e comércio ilegal. Desde a década de 90, estudos vêm apontando a possível relação entre a exposição ambiental e ocupacional a agrotóxicos organoclorados e o desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como os cânceres de mama, pulmão, estômago, pâncreas e próstata (Baris, *et al*, 2000).

Um estudo realizado por (Meyer *et al*, 2003) com dados de mortalidade por câncer na região serrana do Rio de Janeiro, mostrou uma elevada incidência de mortes por cânceres de estômago, esôfago e laringe entre homens agricultores no período de 1979 a 1998, comparado a outras populações masculinas da mesma faixa etária . Esses autores discutem a relação entre a exposição ocupacional a organoclorados, entre outras classes de agrotóxicos, com a incidência de casos tão significativa.

Os agrotóxicos podem causar diversos efeitos sobre a saúde humana sendo muitas vezes fatais. Estes podem se manifestar de varias formas, tais como: problemas ligados à fertilidade, indução de defeitos teratogênicos e genéticos, câncer. Também são relatados efeitos deletérios sobre os sistemas nervoso, respiratório, cardiovascular, genito-urinário, gastro-intestinal, pele, olhos, além de alterações hematológicas e reações alérgicas a estas substâncias (McCauley, *et al.*; 2001).

É importante registrar que os dados oficiais brasileiros sobre intoxicações por agrotóxicos não retratam a realidade do país. São insuficientes, parciais, fragmentados, desarticulados e dispersos em várias fontes de dados - p.ex: Comunicação de Acidente do Trabalho (CAT); Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica (SINITOX); Sistema de Mortalidade (SIM); Sistema de Internação Hospitalar (SIH); Sistema Nacional de Informação de Agravos Notificáveis (SINAN).

A Portaria N ° 777, do Ministério da Saúde, publicada em 28 de abril de 2004, entre outros pontos, define as intoxicações exógenas, entre elas, aquelas causadas por agrotóxicos, como de notificação compulsória. Define ainda, que o instrumento de Notificação Compulsória é a Ficha de Investigação, padronizada pelo Ministério da Saúde, segundo o fluxo do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

2.3 FATORES GENÉTICOS E METABOLISMO DOS GENES CANDIDATOS.

A maioria das anomalias craniofaciais não possuem características monogênicas, normalmente apresentam penetrância incompleta, isto é, ausência de expressão fenotípica em uma porcentagem de indivíduos que apresentam um dado genótipo (Peterson-Falzone, 2011). A variação na penetrância pode ser ocasionada por vários motivos, em especial pela interação do gene em questão com outros genes e pela influência ambiental (Reiter *et al.*, 2012). Com o intuito de se conhecer um pouco mais estes aspectos genéticos envolvidos na etiologia da fissura lábio palatina, vários estudos têm focado na investigação de genes polimórficos em grupos de pacientes acometidos com fissuras lábio palatinas e grupo de pacientes sem fissura lábio palatina (grupo controle). Porém, para seleção do gene candidato à fissura lábio palatina deve-se levar em consideração não apenas o grupo de genes envolvidos no desenvolvimento das estruturas da cabeça e da face como também aqueles que são influenciados por perturbações ambientais durante o desenvolvimento embrionário (Prescott *et al.*, 2001).

A seleção dos polimorfismos potencialmente candidatos é também realizada baseando-se em suas propriedades funcionais no local (quando o polimorfismo afeta a região promotora do gene, estes influenciam potencialmente a expressão gênica) e momento de expressão, na localização cromossômica (região codificadora, pois estes podem alterar a seqüência de aminoácidos da proteína final), na homologia com modelos animais (Prescott *et al.*, 2001) ou previamente associados com patologias e alterações do desenvolvimento (Antunes *et al.*, 2012).

Os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) são formas variantes da seqüência de DNA que podem estar presentes nos indivíduos de uma mesma população dentro de um espectro biologicamente normal (Kornman *et al.*, 1997). Genes que potencialmente representam um papel

na etiologia de uma determinada alteração de desenvolvimento, alteração no quadro fisiológico ou patológico são determinados como potenciais candidatos a esta alteração (Erickson, 2010).

A hipótese de que a forma variante possa estar associada à função alterada de um gene e possa estar envolvida com a ocorrência da fissura lábio palatina pode ser analisada através das frequências desses polimorfismos em indivíduos portadores de fissura lábio palatina (Prescott *et al.*, 2000).

2.4 GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE AGROTÓXICOS

2.4.1 *CYP2E1 Indel*

O gene citocromo P450 2E1 (*CYP2E1*), Fig(2) está localizado no cromossomo 10 (região 10q24). Ele codifica uma proteína de aproximadamente 57 KDa, é formado por nove éxons e oito íntrons (Wang *et al.*, 2009). Este gene é um membro da superfamília P450 e está envolvido na oxidação metabólica de compostos com baixo peso molecular, como as N-nitrosaminas e benzenos, em processos de fase 1 (Gianfagna *et al.*, 2008).

Um polimorfismo do tipo INDEL, Fig(3) que são variações dos tipos inserção e deleção de pequenos fragmentos de DNA (Santos *et al.*, 2010), de 96 pares de bases, presente na região promotora do *CYP2E1*, está relacionado à inativação da função enzimática (Das Roy *et al.*, 2008). Estudos recentes associam a presença da inserção de 96 pb do gene *CYP2E1* com o aumento do risco para desenvolvimento de algumas formas de câncer, como o câncer colorretal e o câncer de esôfago (Morita *et al.*, 2008).

O trabalho de Chevrier (2007), visando verificar associação de xenobioticos com FLP, observou associação entre o uso de álcool por mulheres grávidas e o polimorfismo no gene *CYP2E1* com aumento do risco da fissura lábio palatina e outros defeitos congênitos.

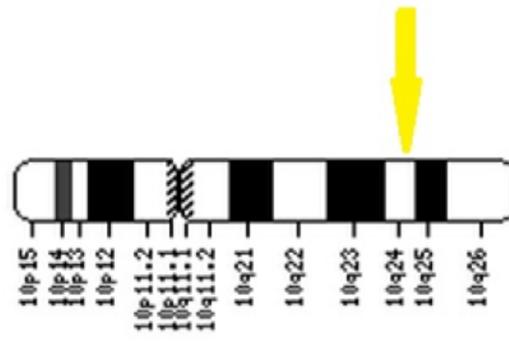


Figura 2: Gene citocromo P450 2E1 (*CYP2E1*)



Figura 3 : INDEL → Marcadores genéticos que apresentam variações dos tipos inserção e deleção de pequenos fragmentos de DNA, sendo, portanto, considerados como polimorfismos bialélicos.

2.4.2 Gene *ABCB1 rs1128503*

O gene *ABCB1* está localizado no cromossomo 7 na região 7q21.12 (Callen, *et al.* 1987)(Fig 4), ele possui 29 éxons, e pertence a família de transportadores ABC (ATP-ligante cassette) que contribui para o mecanismo de resistência a multidrogas (MDR) (Rubiś *et al.*2012).

Os transportadores ABC desempenham um papel predominante no controle da passagem de xenobióticos e toxinas para o cérebro (Pardridge, 2010), mas os seus mecanismos de regulação ainda não são completamente compreendidos. (Lemmen *et al.* 2013)

O gene *ABCB1* codifica a proteína transmembranar de grandes dimensões P-Glicoproteína que é parte integrante da barreira sangue-cérebro e funciona como uma bomba de transporte de

drogas para transporte de uma variedade de drogas a partir do cérebro de volta para a corrente sanguínea (NCBI, 2013).

O aumento da expressão e amplificação das sequências de *ABCB1* geralmente são encontradas em um subtipo de multidroga resistente da leucemia humana e células de carcinoma ovariano. A superexpressão do P-glicoproteína-1 parece uma característica consistente das células de mamíferos mostrando uma resistência para drogas multiplas anticancer e tem sido postulado para mediar a resistência a drogas (Riordan *et al.*, 1985).

Singh, *et al.* 2012, sugeriram que a dose de antidepressivo necessária para os pacientes pode ser prevista pelo SNP rs1128503 assim, têm-se uma evidência de que este polimorfismo pode influenciar significativamente na atividade desta proteína.

No estudo de Omoumi *et al.*(2013), o alelo T no rs1128503 foi associado com maior risco de fissura lábio palatina não síndrômica, com isso fornece evidências de que polimorfismos potencialmente funcionais em *ABCB1* fetais modulam o risco de FLP não síndrômica.

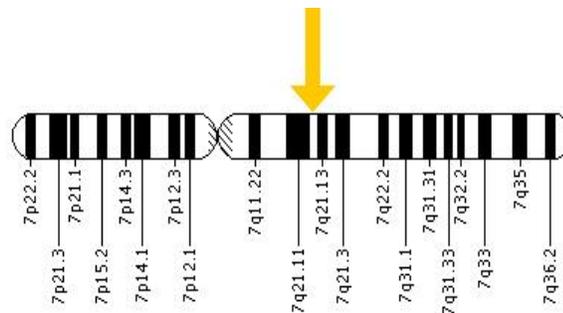


Figura 4: Cromossomo 7 na região 7q21.12

2.4.3 Gene *AHR*rs 2066853

O receptor de hidrocarboneto aromático (AHR) é um membro da família de fatores de transcrição Per/Arnt/Sim (PAS). O gene *AHR* é um mediador conhecido da resposta tóxica para o potente herbicida 2,3,7,8-tóxico persistente tetracholordibenzo-p-dioxina (TCDD), bem como regular a expressão de vários genes, tais como o *CYP1A1*, envolvidos no metabolismo de

substâncias tóxicas, além de modular a proliferação celular (Puga *et al.*, 2000; Santini *et al.*, 2001; Huang e Elferink, 2005; Mitchell *et al.*, 2006).

O gene *AHR* está localizado no cromossomo 7, na região 7p21.1 Fig. (5) e possui 11 éxons e 10 íntrons, ele regula enzimas metabolizadoras de xenobióticos e codifica a ligação-ativação do fator de transcrição envolvido na regulação das respostas biológicas aos hidrocarbonetos aromáticos planares. (NCBI, 2013)

Ohtake *et al.* 2003, sugere que AHR/ARNT formam um complexo básico helix-loop-helix que medeia a maioria dos efeitos tóxicos da dioxina e ele demonstrou que a ativação agonista do heterodímero AHR/ARNT está diretamente associado com os receptores de estrógeno ER- α e ER- β .

Como o gene *AHR* é conhecido como mediador de respostas tóxicas, ele foi utilizado no trabalho de Rocas (2011), onde foi relatado que as mutações no domínio de transativação de AHR estão ligados a sensibilidade para a letalidade aguda da TCDD.

O SNP rs2066853, também foi associado com a excreção urinária de 1-OHP (1-hidroxipireno) que é um biomarcador de exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e foi estudado em trabalhadores de coqueria de duas fábricas de briquetes no sul da China (Chen, 2007).

Kayano *et al.* 2004, não obtiveram resultado significativo para os genes *AHR* e *CYP1A1*, porém seus resultados sugeriram que o ARNT está envolvido no desenvolvimento de fissuras orais não síndrome na população japonesa em mães que obtiveram contato com o TCDD.

Os resultados de Jang *et al.* 2007, sugerem que os antagonistas de *AHR*, tais como alfa-naftoflavona podem ser candidatos promissores para a redução da incidência e gravidade de malformações fetais causadas por exposição em útero de TCDD.

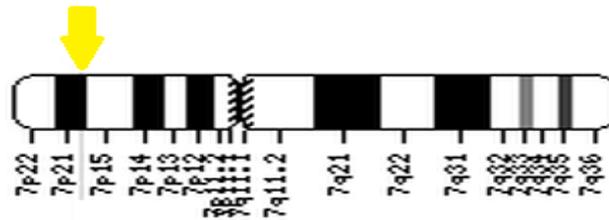


Figura 5: cromossomo 7, na região 7p21.1

2.4.4 Gene *EPHX1* rs 1051740

O gene Epoxide Hydrolase está localizado na posição 1q42.12, Fig.(6) e contém 9 éxons separados por 8 íntrons. Os íntrons possuem de 335 a 6696 pares de bases e possuem muitos DNA repetitivos, incluindo 18 sequencias de Alu (cada uma com mais de 100 nucleotídeos de comprimento) no interior de 4 íntrons (Hassett *et al.*, 1994).

Epóxido hidrolases desempenham um papel importante tanto na ativação e desintoxicação de substâncias químicas exógenas, tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

Strickler *et al.*, 1985, levantaram a hipótese de uma forma mutante da epóxido hidrolase microsomal como a base molecular para reações anormais a fenitoína e algumas outras drogas.

A Fenitoína (difenilhidantoína, dilantina) é metabolizada pelo citocromo P-450 monooxigenases para vários produtos oxidados, incluindo metabolitos hidroxilados e diidrodiol. Óxidos de areno, que são compostos reativos eletrofílicos, são intermediários nestas reações oxidativas. Se não desintoxicado, metabólitos do óxido areno podem ligar covalentemente as macromoléculas celulares, resultando na morte da célula, a mutações, tumores, malformações congênitas, e, atuando como haptenos, pode conduzir a fenômenos secundários imunológicos. Nos animais, os efeitos tóxicos da fenitoína, incluem hiperplasia gengival e teratogenicidade, e esses efeitos têm sido atribuídos aos metabólitos de óxido de areno (NCBI, 2013).

Para Singh *et al.* (2009), os GSTs, NATs, NQOs e EPHXs são essenciais para o metabolismo de xenobióticos e potenciais pró-cancerígenos que podem estar envolvidas no início

do câncer. Como sugerido por Noursome (2013), onde um haplotipo no gene *EPHX1* está relacionado ao aumento do risco de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).

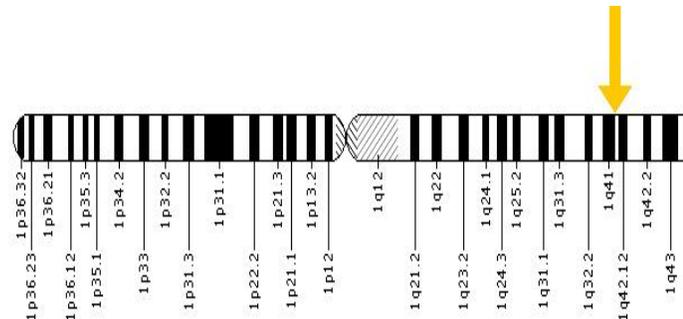


Figura 6: Cromossomo 1 na região 1q42.12

2.4.5 Gene *PON1* rs662 rs 854560

A família de genes de paraoxonase (PON) inclui três genes, *PON1*, *PON2*, e *PON3*, alinhados um ao lado do outro no cromossomo 7. *PON1* humana é sintetizada no fígado e secretada para o sangue, onde ela é associada exclusivamente com a lipoproteína de alta densidade (HDL) e pode proteger contra o desenvolvimento de aterosclerose (Draganov *et al.*, 2005).

PON1 possui 9 éxons e hidrolisa os metabólitos tóxicos de vários inseticidas organofosforados, incluindo paratião, diazinon, clorpirifos, e bem como agentes nervosos, tais como o sarin e soman (Clendenning *et al.* 1996).

Além disso, Singh *et al.* (2011) obtiveram resultados que indicam que o polimorfismo no gene *PON1* pode modular danos ao DNA induzidos por alguns pesticidas, possivelmente por meio de interações gene-ambiente.

Humbert *et al.*(1993) fizeram estudos com animais e demonstraram que PON injetado por via intravenosa proporciona proteção contra a toxicidade do organofosforado paraoxon, reforçando a ação deste gene sobre os pesticidas.

2.4.6 Gene *MTHFD1* rs2236225

O Gene *MTHFD1* está localizado no cromossomo 14, na região 14q24Fig(7), possui 28 éxons e codifica uma proteína MTHFD1 trifuncional compreendendo 5,10-metileno-desidrogenase, 5,10-methenyltetrahydrofolate cicloidrolase, e 10-formiltetraidrofolato sintetase (OMIM 2013).

Estas três reações sequenciais são envolvidas na interconversão de derivados de 1-carbono de tetrahydrofolato (THF), que são substratos para a metionina, a timidilato, e de novo a síntese da purina. Nos eucariotos, as três atividades enzimáticas são propriedades de uma única proteína, um homodímero de polipéptidos de 100 kD (Hum *et al.*, 1988).

Bufalino *et al.* (2010), fizeram um estudo em uma população brasileira e sugeriram que a variante genética rs2236225 do gene *MTHFD1* que metaboliza o ácido fólico, pode modular a suscetibilidade materna de ter um filho com Fissura Láblio/Palatina.

Mills *et al.* (2008), estudaram uma população irlandesa e encontraram associações tanto para fissuras palatinas quanto para fissuras labiopalatinas com o polimorfismo 1958 G -> A no gene *MTHFD1* em pacientes e suas respectivas mães.

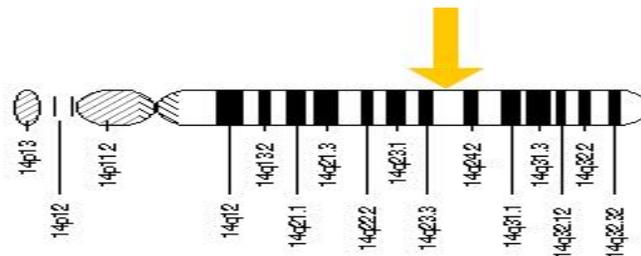


Figura 7: Cromossomo 14, na região 14q24

3 JUSTIFICATIVA

Em nossa região, um grande número de indivíduos acometidos por fissuras labiopalatinas são oriundo de zonas rurais, onde sabidamente se faz uso indiscriminado de agrotóxicos nocivos a saúde humana, muitos dos quais tem alto potencial teratogênico (Loffredo, *et al* 1994).

Assim, este projeto investigou se existe a correlação entre genes de metabolismo com a exposição a agrotóxicos na etiogênese de fissuras labiopalatinas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL: Investigar a correlação entre variantes polimórficas dos genes *PONI(rs662)*, *PONI(rs854560)*, *ABCBI*, *AHR*, *EPHX1*, *MTHFD*, *CYP2E1* (INDEL) e a exposição á agrotóxico na etiogênese das fissuras labiopalatinas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar a incidência de fissuras labiais, palatinas ou labiopalatinas em indivíduos com parentais expostos e não expostos a agrotóxicos;
- Avaliar as frequências das diferentes variantes polimórficas dos genes *PONIRS662*, *PONIRS854560*, *ABCBI*, *AHR*, *EPHX1*, *MTHFD1*, *CYP2E1* em indivíduos portadores de fissuras labiopalatinas.
- Correlacionar as diferentes variantes alélicas e genotípicas dos respectivos genes, de origem materna e/ou do probando, com a gênese e com os aspectos clínicos das Fissuras Labiopalatinas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS.

5.1 AMOSTRA

Este estudo foi composto por uma amostra total de 83 indivíduos afetados por Fissuras Labio Palatinas/ Palatinas e ou Labiais (exclusivamente nascidos no Estado Pará) e 83 mães dos pacientes acometidos.

Todos os participantes foram recrutados entre dezembro de 2010 e dezembro de 2012 no setor de Fissuras orais do Hospital Ophir Loyola (HOL).

O critério de exclusão utilizado na pesquisa foi à presença de outras síndromes associadas às Fissuras Labio Palatinas.

Durante o estudo, foi realizado um contato prévio com cada paciente, onde foram fornecidas informações acerca do objetivo da pesquisa, além de um formulário para assinatura do consentimento pós-informado para posterior coleta do material.

Um questionário (Anexo I) foi aplicado visando observar várias características sócio-ambientais onde as genitoras dos pacientes serão arguidas sobre hábitos tabagistas e etilistas, além da exposição a agrotóxicos ou outros compostos que tenham potencial teratogênico.

Em relação aos aspectos clínicos, foram observados os tipos de fissuras, se labial, palatina ou lábio-palatina. Reincidência familiar também será considerada em nossas análises. As amostras de material biológico foram coletadas na forma de sangue.

As amostras de sangue (5 a 8 mL) foram obtidas por punção venosa e colhidas em tubos de ensaio de vidro com capacidade para 10 mL, contendo 54 μ L EDTA. Logo após as coletas, as amostras foram adequadamente identificadas com o nome, número do paciente, dia da coleta. As amostras de sangue foram armazenadas a - 20°C até o momento da extração do DNA.

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA, a partir das amostras de sangue periférico, foram realizadas conforme o protocolo estabelecido pelo **Invirsob spin blood mini kit) a seguir:**

1. Transferir 200 μ l de sangue para um tubo de reação de 1.5 ml.
2. Adicionar 200 μ l de **Lysis Buffer HL**, misturar pipetando para cima e para baixo 5 vezes e incubar por 3 minutos à 56°C com movimento contínuo. Adicionar 20 μ l de **proteinase K** elevar ao vórtex (1 segundo).
3. Incubar a reação por 5 minutos à 56° C com movimento contínuo em banho Maria.
4. Adicionar 200 μ l de **Binding Buffer HL** e misturar com a amostra usando o vórtex ou pipetando para cima e para baixo por 5 vezes. Transferir a mistura para um tubo **RTA Spin Filter** e incubar por 1 minuto.
5. Centrifugar por 2 minutos a 12.000 rpm, descartar o filtrado e levar o **RTA spin filter** para um novo tubo **RTA receiver tube**.
6. Adicionar 500 μ l de pré Wash Buffer ao RTA spin filter e centrifugar por 1 minuto à 12.000 rpm. Descartar o filtrado e passar o filtro para um novo tubo.

7. Adicionar 700 µl de Wash Buffer ao RTA spin filter e centrifugar por 1 minuto a 12.000 rpm. Descartar o filtrado e passar o filtro para um novo tubo.
8. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer** ao **RTA spin filter** e centrifugar por 1 minuto a 12.000 rpm. Descartar o filtrado e passar o filtro para um novo tubo.
9. Transferir o filtro para um tubo **RTA receiver** de 2 ml e centrifugar por 4 min à velocidade máxima (14.000) rpm para eliminar completamente o etanol.
10. Transferir o filtro para um novo tubo de **1,5 ml receiver tube**. Adicionar **Elution Buffer D** pré aquecido a 56° C. incubar a temperatura ambiente por 1 min.
11. Centrifugar a 9.500 rpm por 1 min, Descartar o RTA filter. O DNA estará no tubo.

Posteriormente, o DNA extraído foi armazenado em freezer -20°C.

5.3 SELEÇÃO DE ENSAIOS

Os marcadores foram previamente selecionados a partir da análise de resultados de trabalhos publicados na literatura e pelo site National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2013), os quais foram analisados observando a importância dos genes na fissura lábiopalatina, a importância clínica e a frequência populacional.

5.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Para análise do INDEL do gene *CYP2E1* foi empregada técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Onde serão utilizadas as seguintes sequências de primers: Forward (5' TGT CCC AAT ACA GTC ACC TCT TT 3') e Reverse (5' GGC TTT TAT TTG TTT TGC ATC TG 3').

Todo o protocolo utilizado para a amplificação do DNA alvo (volume da reação, concentração de DNA em ng, concentração de magnésio, concentração da enzima, concentração de primer em picomoles, aditivos da PCR, temperatura de extensão e anelamento), são homozigotas QQ para o polimorfismo MTHFD1. Anteriormente a técnica de Snapshot, será necessário para realizar a amplificação das amostras através da técnica de Reação de Cadeia da Polimerase (PCR). Será utilizado o kit Qiagen Multiplex PCR, seguindo instruções do fabricante. O termociclador utilizado para a reação de amplificação será o *Veriti™ 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

5.5 SNaPshot

A técnica de SNaPshot Multiplex System é um método baseado em extensão de primer desenvolvido para análises de polimorfismos de base única (SNPs) (Figura 9). Por causa da sua capacidade de ser realizada em multiplex, podem ser analisados 10 SNPs em uma única reação, independentemente das suas posições no cromossomo ou a distância de separação entre SNPs de loci vizinhos.

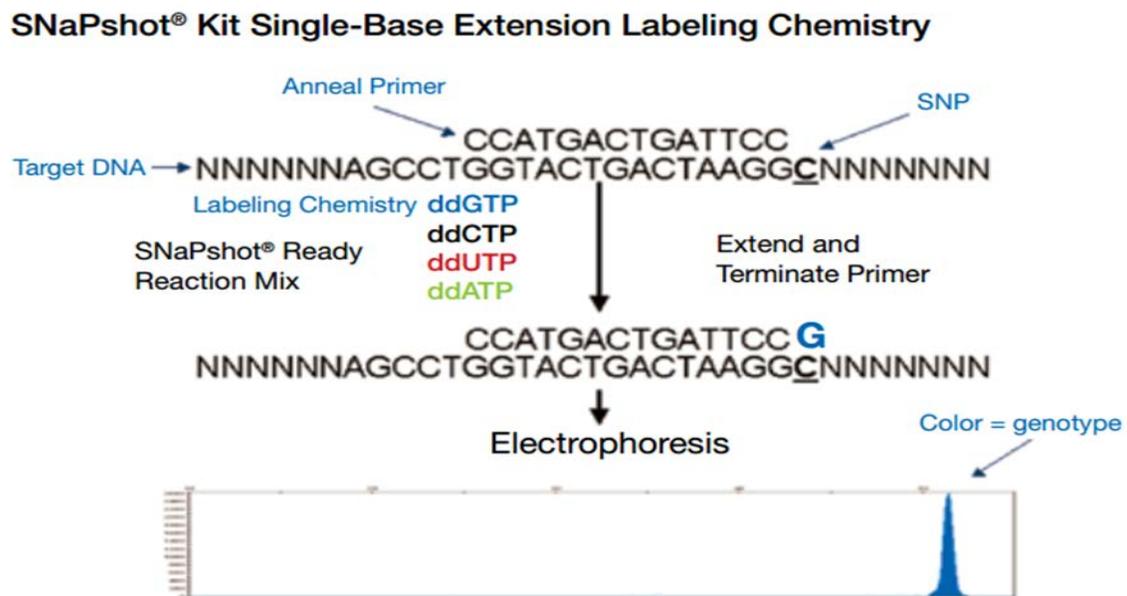


Figura 9: A leitura da técnica de SnaPshot a partir da eletroforese capilar, em um sequenciador automático, de um polimorfismo de base única de uma sequência de DNA (Fonte: invitrogen 2013).

A técnica de SnaPshot Multiplex foi realizada através do SNaPshot® Kit Single-Base Extension Labeling Chemistry seguindo as instruções do fabricante. Os polimorfismos de base única (SNPs) que foram analisados são: ABCB1 (rs1128503), AHR (rs2066853) e EPHX1 (rs1051740). Esses SNPs após terem seus primers amplificados por PCR foram marcados com sondas fluorescentes e foram tratados pela Shrimp alkaline phosphatase (SAP). Para poder gerar os dados por uma eletroforese capilar em sequenciador automático (ABI 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). A leitura foi feita através dos picos gerados pela diferença de tamanho dos fragmentos e pela fluorescência gerada para cada variante polimórfica.

5.6 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa está de acordo com os princípios éticos básicos das diretrizes e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça.

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (**anexo II**).

Considerando o caráter analítico do estudo, os pacientes e familiares não foram expostos a nenhum risco maior. O material biológico colhido (sangue periférico ou saliva) foi obtido por procedimentos pouco invasivos (punção venosa periférica).

A estratégia utilizada para o recrutamento dos participantes foi informar aos pacientes em consultas de rotina no ambulatório do Hospital Ophir Loyola (HOL) sobre a pesquisa e ocasionalmente a realização do convite a participar da mesma.

Os objetivos da pesquisa, os riscos e os benefícios ao paciente, familiares e população afetada pela doença em questão, foram explicados às famílias, e as dúvidas levantadas foram esclarecidas. As famílias que concordaram em participar assinaram um termo de consentimento livre esclarecido (**anexo III**).

6 ANÁLISE DOS DADOS.

A análise estatística foi realizada através dos programas SPSS v. 12.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA) e Bioestat 5.3.

Os testes realizados foram, o teste de Regressão Logística Multipla, Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher. Com nível de significância a ser considerado será $p \leq 0,05$.

7 RESULTADOS

O número total de amostras analisadas foi de 166 indivíduos, sendo 83 pacientes acometidos por fissura, com idade média de 7 anos (DP 5 anos) e 83 mães dos mesmos. Em nossas amostras, o gênero masculino foi 64% do total de acometidos.

Nosso resultado consiste de quatro análises diferentes, para cada polimorfismo. Inicialmente, observamos as diferenças entre as frequências genotípicas encontradas nos acometidos e nas mães destes e aquelas das populações de indivíduos hígidos. Isto visando

encontrar diferenças entre estes genótipos que possam justificar a gênese das FLP, frente à exposição das mães, e intrauterinamente, dos filhos ao agrotóxico.

Em um segundo momento, verificamos se houveram diferenças entre os genótipos maternos e dos acometidos, que pudessem representar diferenças significativas entre estes dois grupos de indivíduos (pois as mães, independentemente da exposição ao agrotóxico, poderiam ter FLP, caso o genótipo fosse de elevada importância) e que possam ter relação com a FLP.

Em uma terceira análise, observamos se os genótipos encontrados nos indivíduos que apresentam FLP, estão relacionados à exposição relatada aos agrotóxicos, como fator etiológico destas más formações.

Em última verificação, visamos, por análise de regressão logística simples, verificar se a característica genotípica desses alvos de estudo, possa ter influenciado no fenótipo do tipo de fissura, seja somente labial, seja palatal ou labiopalatal.

A distribuição dos tipos de fissuras entre os acometidos foi de 12% para fissuras somente labiais, 19% para fissuras somente palatais e 69% das fissuras em nosso grupo amostral atingiam o lábio e o palato.

Entres as mães envolvidas no estudo, 25% declarou ter contato cotidianamente com agrotóxicos, incluindo-se o período de gravidez e parto dos indivíduos com FLP.

A distribuição encontradas em nossas amostras, de frequências genotípicas referentes aos polimorfismos das enzimas envolvidas, entre outras coisas, no metabolismo dos agrotóxicos, assim como as frequências populacionais provindas de bancos de dados - HapMap e SNP500Cancer - sobre as variações humanas (NCBI, 2013) estão dispostos nas tabelas 3 a 9.

Cabe ressaltar que, de acordo com Santos *et al.* (2010) a população miscigenada do Estado do Pará, nossa origem amostral, possui em sua constituição genética 60% de contribuição europeia, 28% de contribuição de ameríndios e 12% de contribuição africana. Assim, observando as frequências alélicas a nível mundial, obtidas da fonte de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2013), e considerando as frequências de populações asiáticas como as de indígenas (pois estes possuem como ancestrais populações asiáticas), realizamos uma estimativa das frequências populacionais de nossa região, de acordo com a ancestralidade descrita acima. Logo, as frequências genotípicas esperadas para a nossa população seriam conforme descritas nas colunas intituladas como “Estimada”.

Em relação aos dois polimorfismos da enzima pon1

Tabela 3 - Distribuição genotípica do polimorfismo do PON1 (rs662).

Genótipos	Acometido N (%)	Mãe N (%)	Global	Caucasiana	Africana	Asiática	Estimada
A/A	19(23,9)	6(7,2)	23(27,7)	36(43,4)	4(4,8)	7(8,4)	24(29)
A/G	64(77,1)	76(91,6)	38(45,8)	39(47,0)	27(32,5)	35(42,2)	36(43,9)
G/G	0(0)	1(1,2)	22(26,5)	8(9,6)	52(62,7)	41(49,4)	23(27,1)

Comparando-se as frequências de nossos achados com a da população global, evidenciamos que o polimorfismo do PON1 (rs854560) apresentou menor frequência de homozigotos (ambos) em nossa população, quando comparados a população global.

Tabela 4 - Distribuição genotípica do polimorfismo do PON1 (rs854560).

Genótipos	Acometido N (%)	Mãe N (%)	Global	Caucasiana*	Africana*	Asiática*	Estimada
A/A	5(6,0)	5(6,0)	43(51,8)	40(48,2)	45(54,2)	72(86,8)	50(59,7)
A/T	77(92,8)	78(94,0)	32(38,6)	22(26,5)	38(55,8)	11(13,3)	21(25,1)
T/T	1(1,2)	0(0)	8(9,6)	21(25,3)	0(0)	0(0)	13(15,2)

*Obtido de SNP500Cancer, por não disponibilização de fonte HapMap.

O polimorfismo do EPHX1

Tabela 5 - Distribuição genotípica do polimorfismo do EPHX1 (rs1051740).

Genótipos	Acometido N (%)	Mãe N (%)	Global	Caucasiana	Africana	Asiática	Estimada
C/C	22(26,5)	1(1,2)	15(18,1)	10(12,1)	1(1,2)	22(26,5)	12(14,8)
C/T	35(42,2)	68(81,9)	30(36,2)	34(41,0)	17(20,5)	35(42,2)	32(38,8)
T/T	26(31,3)	14(16,9)	38(45,8)	39(47,0)	65(78,3)	26(31,3)	38(46,4)

O SNP de MTHFD1

Tabela 6 - Distribuição genotípica do polimorfismo do MTHFD1 (rs2236225).

Genótipos	Acometido N (%)	Mãe N (%)	Global*	Caucasiana	Africana	Asiática	Estimada
C/C	11(13,3)	1(1,2)	-	28(33,7)	54(65,1)	43(51,8)	35(42,6)
C/T	68(81,9)	70(84,4)	-	40(48,2)	27(32,5)	35(42,2)	37(44,6)
T/T	4(4,8)	12(14,5)	-	15(18,1)	2(2,4)	5(6,0)	11(12,8)

*Não disponibilizado

A distribuição de frequências de ABCB1

Tabela 7 - Distribuição genotípica do polimorfismo do ABCB1 (rs1128503).

Genótipos	Acometido N (%)	Mãe N (%)	Global	Caucasiana	Africana	Asiática	Estimada
C/C	2(2,4)	1(1,2)	28(33,7)	22(26,5)	62(74,7)	11(13,3)	24(28,6)
C/T	72(86,8)	71(85,6)	37(44,6)	47(56,6)	21(25,3)	36(43,3)	41(49,2)
T/T	9(13,3)	11(13,3)	18(21,7)	14(16,9)	0(0)	36(43,3)	18(22,3)

No polimorfismo de AHR

Tabela 8 - Distribuição genotípica do polimorfismo do AHR (rs2066853).

Genótipos	Acometido N (%)	Mãe N (%)	Global	Caucasiana	Africana	Asiática	Estimada
A/A	2(2,4)	0(0)	5(6,0)	1(1,2)	18(21,7)	17(20,5)	8(9,1)
A/G	33(39,8)	30(36,2)	28(33,7)	15(18,1)	39(47,0)	39(47,)	25(29,6)
G/G	48(57,8)	53(63,9)	50(60,3)	67(80,7)	26(31,3)	27(32,5)	51(61,3)

A alteração do tipo INDEL de CYP2E1

Tabela 9 - Distribuição genotípica do polimorfismo do CYP2E1 (indel).

Genótipos	Acometido N (%)	Mãe N (%)	Global	Caucasiana	Africana	Asiática	Estimada*
ins/ins	1(1,3)	0(0)	-	-	-	-	1(1,3)
ins/del	18(22,8)	20(25,3)	-	-	-	-	9(11,4)
del/del	60(75,9)	59(74,6)	-	-	-	-	69(87,3)

*Frequência baseada em 110 indivíduos da mesma área geográfica em trabalho realizado pelo mesmo grupo de pesquisa (Pinto *et al.*, 2012).

8 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

CYP2E1

Através da técnica de Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada a análise do polimorfismo INDEL do gene CYP2E1 nas 82 amostras. Foram visualizadas 47 homozigotas (57%) para deleção (DEL/DEL) e 30 heterozigotas (37%) (DEL/INS), não houve resultados em 5 amostras (6%), além disso não foram observadas amostras homozigotas para inserção.

Na análise da frequência alélica, a maioria das amostras estudadas possuía o alelo deleção (76%), enquanto que o alelo inserção foi encontrado em 18% das amostras e em 6% não obtivemos resultados.

No questionário respondido pelos pacientes e pais algumas informações puderam ser obtidas como o tipo de fissura e a relação com agrotóxicos. A partir dessas informações foi constatado que 59% dos pais não tinham contato com agrotóxicos, 22% tinham contato direto e 19% não souberam informar

Nas análises estatísticas para as comparações entre os tipos de fissura restrita ao lábio com os outros tipos estudados, e no segundo caso, restrita a fissura lábiopalatina comparada aos outros tipos de fissuras, sendo todos esses em relação ao uso de agrotóxicos não tiveram valores significativos para $p \leq 0,05$.

Para as análises dos genótipos dos pacientes e dos genótipos de suas respectivas mães em relação ao uso de agrotóxicos não obtivemos resultados significativos para $p \leq 0,05$.

Porém, um estudo caso-controle francês envolvendo 175 famílias, investigando metabolismo de xenobióticos (mais especificamente o tabaco) na gênese de fissuras orais não-sindrômicas, verificou associação estatística entre diferentes variantes polimórficas e o risco para o aparecimento de fissuras em crianças, tanto em relação a variante CYP1A1*2C nos fissurados e mães, quanto na variante alélica CYP2E1*5 dos acometidos pela má-formação (Chevrier *et al.*, 2008).

Chevrier *et al* 2008 em seus estudos, achou dados de crianças que possuíam a variante CYP2E1*5 e que suas mães tiveram exposição ao tabaco durante a gravidez, tiveram uma diminuição estatisticamente significativa do risco para a fissura, se comparado com o genótipo homocigoto selvagem para este gene.

Chevrier *et al*, 2007 ainda relata em outro estudo que precisa realizar mais estudos dos polimorfismos do gene *CYP2E1*, pois acreditam que estes polimorfismos são fortes candidatos para o aumento do risco de formação de fissuras orais durante o desenvolvimento embrionário.

Johnsrud *et al*, 2003, mostrou que indivíduos com 90 dias de idade pós-natal que possuíam os alelos CYP2E1*1D produziam menos proteína *CYP2E1* se comparados a indivíduos da mesma idade e com os alelos homocigotos para CYP2E1*1C.

Sharma *et al*, 2013 encontrou uma maior expressão da proteína *CYP2E1* no sangue de agricultores do norte da Índia que eram expostos constantemente à agrotóxicos.

Ahmad *et al*, 2010, fizeram testes aplicando os pesticidas maneb e/ou paraquat de forma intraperitoneal em ratos, e viram que a expressão e a atividade catalítica do *CYP2E1* no fígado de rato aumentou significativamente.

A partir do nosso número amostral considerando a análise do polimorfismo INDEL do gene *CYP2E1* não obtivemos valores estatísticos significativos que pudessem provar a influência do uso de agrotóxicos na etiologia da fissura lábiopalatina, intermediada pela ação enzimática do produto deste gene. Por isso, sugerimos que um novo estudo seja realizado com um maior número amostral.

MTHFD1

Segundo Aquino, *et al*. 2013, o polimorfismo no gene *MTHFD1* (rs 2236225) foi previamente associado à susceptibilidade materna de ter um filho com fissura lábio palatina não síndrômica nas população brasileiras .Eles não encontraram associação deste polimorfismo com a fissura lábio palatina.

Bufalino *et a.*,2010, em seus estudos diz que mães homozigotas para o genótipo AA do polimorfismo rs2236225 do gene *MTHFD1*, possuíam 2 vezes mais risco de ter crianças com fissura lábio palatina do que mães com genótipo GG ou GA.

Mostowska *et al*, 2010 em seus estudos encontrou uma associação entre o polimorfismo (1958 G-->A) no gene *MTHFD1* e a fissura labial e palatina. O autor acredita que precisa fazer mais estudos sobre o assunto.

Ja nos experimentos de Palmieri *et al*,2008 não houve associação significativa entre os polimorfismos (A1958G e G401A) no gene *MTHFD1* e o risco de formação de fissura.

PONI

Segundo Belin *et. al.*(2012), o polimorfismo Leu54Met (rs854560) em *PONI* está associado significativamente (p=0,007) ao risco de desenvolver Doença de Parkinson, a partir da exposição a pesticidas. Corroborando a isto, a investigação, realizada por Andersen *et. al.*, indica uma interação

gene-ambiente entre a exposição pré-natal a pesticidas e a heterogeneidade do gene *PONI* que afeta indicadores de risco cardiovascular.

Em contrapartida, Gonçalves *et. al.*(2012), afirmou que em seus achados, não houve associação entre os polimorfismos rs662 e rs854560 do gene *PONI* com o risco aumentado de desenvolver leucemia infantil.

Segundo Ayotte *et. al.*(2012), em seus experimentos as concentrações de mercúrio no sangue foram inversamente associados com atividades do polimorfismo do gene *PONI*, inclusive rs662 e rs854560, enquanto que as concentrações de selênio no sangue foram associadas positivamente com polimorfismos do gene *PONI*.

Cole *et. al.* (2012), através de resultados de um exame neurocomportamental realizado em ratos *PONI* - / - (nocaute) expostos a clorpirifos-Oxon (CPO) diariamente nos dias pós-natal (PNDs) 4 a 21, constataram que não houve efeitos significativos de exposição neonatal à CPO sobre o desenvolvimento de reflexo, da coordenação motora, comportamento em campo aberto, dentre outros. No entanto, houve efeito significativo da exposição repetida diariamente à CPO na agitação, no peso corporal, entre outros.

ABCBI

Fetos são constantemente expostos à xenobióticos e outros teratógenos no início do desenvolvimento, uma vez que são expostos às substâncias presentes no sangue materno. Desta forma, os fetos devem se proteger destes elementos no intuito de prevenir defeitos no desenvolvimento, incluindo a formação de fenda orofacial (Pacifici *et al.*, 1986).

Estudos têm demonstrado que enzimas responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos aparecem bem cedo no desenvolvimento, configurando um mecanismo de proteção para os fetos. Outro possível mecanismo de proteção está relacionado com a função de transportadores de membrana, especificamente P-glicoproteínas, que são capazes de proteger algumas células de xenobióticos, através do rápido bombeamento do composto para fora da célula. Tem sido observado que estas proteínas atuam prevenindo a captação de certos teratógenos pelo cérebro, fluido cerebrospinal, testículos e tecidos fetais (Pacifici *et al.*, 1986; Borst and Elferink, 2002).

Em humanos, as P-glicoproteínas são codificadas pelos genes *MDR1* (*ABCB1*) e *MDR2*, enquanto que em roedores existem três genes correlatos, denominados de *mdr1a*, *mdr1b* e *mdr2* (Croop *et al.*, 1989; Hsu *et al.*, 1989; Borst and Schinkel, 1996). As proteínas codificadas por estes genes contêm porções hidrofílicas que permitem sua inserção na membrana celular. Além disso, possuem especificidade a diversos substratos que as permite bombear para fora das células vários tipos de xenobióticos (Borst and Elferink, 2002).

Em um estudo desenvolvido por Rawless *et al.* (2007) em camundongos, foi observado que a presença da proteína *mdr1a* no feto claramente reduziu a toxicidade à dilantina, um composto teratogênico. A ausência completa de fetos afetados com o genótipo *mdr1a*^{+/+} fortalece essa afirmação. Além disso, foi observado um aumento da fenda esporádica nos fetos com genótipo *mdr1a*^{-/-}. Isso sugere que a P-glicoproteína *mdr1a* é capaz de remover os teratógenos do tecido fetal e, portanto, sua presença em tecidos fetais reduz o risco de desenvolvimento de fenda palatina.

De acordo com Lankas *et al.* (1998), a exposição ao teratógeno L-652,280 de fetos de camundongos CF-1 mutantes exerce efeitos significantes no seu desenvolvimento, uma vez que seus experimentos demonstraram que apenas os fetos com expressão reduzida ou sem expressão da proteína *mdr1a* apresentaram sensibilidade à indução da fenda palatina pelo composto.

Bliek *et al.* (2009) investigaram a associação entre a presença do polimorfismo 3435C>T na mãe e na criança, o uso de medicação durante a gravidez e o risco de desenvolvimento de fendas labiopalatinas. Os resultados demonstraram que o genótipo 3435TT resulta em um aumento de seis vezes no risco de gerar uma criança com fenda labiopalatina em mães que utilizaram medicação durante a gravidez. Segundo os autores, a embriogênese pode ter sido afetada pelo fato de que o genótipo 3435TT codifica uma P-glicoproteína com atividade reduzida e, portanto, aumenta a exposição das células fetais aos xenobióticos.

Omoumi *et al.* (2013) observaram que o alelo T do polimorfismo no gene *MDR1* (rs1128503) estava associado com um risco maior ao desenvolvimento de fendas orais não-sindrômicas. Vale ressaltar que não foi encontrada associação estatística entre o genótipo polimórfico da mãe (mãe versus controle) e a presença de fendas orais, sugerindo que o risco para o desenvolvimento de fendas orais não-sindrômicas é determinado pelo genótipo fetal do gene *MDR1* e não pelo genótipo materno.

De modo contrário, Martinelli *et al.* (2011) não observaram associação positiva entre polimorfismos no gene *MDR1* e o desenvolvimento de fendas labiopalatinas.

Tem sido reportado que alguns pesticidas interagem com a proteína MDR1, agindo como substratos ou como inibidores. De acordo com Shabbir *et al.* (2005), a incubação de células HepG2 de hepatoma com o pesticida DDT resultou na retenção do substrato da proteína MDR1, rodamina 123, no interior da célula, sugerindo que o DDT inibe a atividade da proteína.

Similarmente, Bircsak *et al.* (2013) examinaram o efeito de duas classes de inseticidas (organoclorina e piretroide) na atividade da proteína MDR1 e relataram que o pesticida DDT, bem como seu metabólito, inibe a atividade desta proteína, revelando um potencial papel dos pesticidas no acúmulo de outros xenobióticos na célula, aumentando a toxicidade.

EPHX1

Segundo Koutros *et al.* (2011), SNPs do gene *EPHX1* foram significativamente associados com o câncer de próstata, devido há uma evidência sugestiva de maior risco (OR maior que 1,0) com o aumento do número de dias de uso de óleo de petróleo / petróleo destilado utilizado como herbicida. De acordo com Zamora *et al.* (2013), nas mulheres de seu estudo, diferentes exposições à solventes foram medidos, e foi encontrada uma associação entre *EPHX1* e *LDGCB* com um padrão de interação com a exposição ao benzeno.

Hassett *et al.* (1994) descreveram que a substituição de His113 para a forma de ocorrência mais comum Tyr113 no exón 3 diminuiu a atividade de *EPHX1* em aproximadamente 40%. De acordo com Tumer *et al.* (2012) e Silveira *et al.* (2010), este SNP, rs1051740, pode desencadear uma susceptibilidade genética para a leucemia infantil e, segundo Sarmanova *et al.* (2001), linfoma em homens, enquanto que em outros estudos não encontraram uma associação com a susceptibilidade (Chauhan., 2012) e os resultados (da Silva Silveira *et al.*, 2009) em leucemia.

AHR

Yamada *et al.*, 2013, analisaram tecidos muscular, ósseo e epitelial de camundongos RCI (Região de controle de Imprinting) expostos ao TCDD, e viram que o TCDD pode suprimir com a baixa expressão de AhR a osteogênese palatal e a miogênese e causar fissura palatina através da falha de um mecanismo de divisão pós-fusional.

Jang *et al*, em seus estudos, sugeriram que os antagonistas AhR tais como alfa-naftoflavona poderiam ser candidatos promissores para a redução da incidência e severidade de malformações fetais causados pela exposição TCDD no útero.

Jacobs *et al*, 2011, utilizou doses orais de 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) em camundongos prenhas e encontrou que a alteração induzida por esta dioxina durante o desenvolvimento palatal no camundongo, pareceu depender da baixa sinalização de atRA, que controla a expressão de AHR, desta forma, observaram que este gene está relacionado ao metabolismo desta toxina. Esse mecanismo é conservado ao longo da evolução dos vertebrados, e portanto, pode ser relevante nos seres humanos.

Bunger *et al*, 2008 Fizeram experiências in vitro com pesticidas e o receptor AHR, e sugeriram que os pesticidas poderiam ativar as vias que afetam o equilíbrio hormonal, mesmo dentro dos limites permitidos, portanto, potencialmente atuando como desreguladores endócrinos.

A distribuição dos gêneros e tipos de fissura foi semelhante aos dados já relatados em estudos prévios em indivíduos com FO de diversas populações.

Entre as mães que participaram do estudo houve relatos de exposição a pelo menos um os fatores ambientais relacionados ao aumento do risco fissuras orais.

Entre as mães entrevistadas neste estudo houve relatos de ingestão de ácido fólico e outras vitaminas durante a gestação como forma de prevenção.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhishek S, Kaur N, Kaur S, Lata M, Sharma JK, Sharma A. Association of *GSTM1* and *GSTT1* gene deletions with susceptibility to DNA damage in the pesticide-exposed workers of Punjab. **Rejuvenation Res.** 2010
- Ahmad I, Shukla S, Kumar A, Singh BK, Patel DK, Pandey HP, Singh C. Maneb and paraquat-induced modulation of toxicant responsive genes in the rat liver: comparison with polymorphonuclear leukocytes. *Chem Biol Interact.* 2010 Dec 5;188(3):566-79. doi: 10.1016/j.cbi.2010.09.023. Epub 2010 Oct
- Antunes L dos S, Kuchler EC, Tannure PN, Lotsch PF, Costa M de C, Gouvêa CV, et al. TGFB3 and BMP4 polymorphism are associated with isolated tooth agenesis. **Odontol Scand.** May 70(3): 202-6. 2012
- Andersen, Helle R; Wohlfahrt-Veje, C; Dalgard, C; Christiansen, L; M Katharina.; Nellesmann, C; Murata, K; K, Tina; Niels, J; Skakkebæk, E e Grandjean, Philippe. Paraoxonase 1 polymorphism and prenatal pesticide exposure associated with adverse cardiovascular risk profiles at school age. **PLoS One.**; 7(5): e36830. 2012
- Ayotte P; Transportadora A; Ouellet N; Boiteau V; Abdous B , Sidi, E A L , Dega M-L Château-t e É. Dewailly. Relation between methylmercury exposure and plasma paraoxonase activity in inuit adults from Nunavik. **Environmental Health Perspectives.**; 119(8): 1077–1083. August 2011
- Baris D, Kwak LW, Rothman N, Wilson W, Manns A, Tarone RE, et al. Blood levels of organochlorines before and after chemotherapy among non-Hodgkin's lymphoma patients. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**; 9:193-7. 2000
- Belim, A C, Anvret, C R, Anna; Paddock, S, Westerlund, M ; Håkansson, Anna; Nissbrandt, Hans; Söderkvist, Peter; Nil Dizdar; Ahmadi A, Anvret, M, Willows, T, Sydow O; Galter D. Association of a protective paraoxonase 1 (PON1) polymorphism in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, Vol 522, Issue 1, pag 30-35. jul 2012.

Bircsak KM, Richardson JR, Aleksunes LM. Inhibition of human MDR1 and BCRP transporter ATPase activity by organochlorine and pyrethroid insecticides. *J Biochem Mol Toxicol.*; 27(2):157-64. doi: 10.1002/jbt.21458. 2013

Bufalino A, Ribeiro Paranaíba LM, Nascimento de Aquino S, Martelli-Júnior H, Oliveira Swerts MS, Coletta RD. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010 Nov;88(11):980-6. doi: 10.1002/bdra.20732. Epub 2010 Oct 1.

Brasil 2004. Ministério da Saúde. *Portaria nº 777*, de 28 de abril de 2004. Dispõe sobre os procedimentos técnicos para a notificação compulsória de agravos à saúde do trabalhador em rede de serviços sentinela específica, no Sistema Único de Saúde – SUS.

Brody, L. C., Conley, M., Cox, C., Kirke, P. N., McKeever, M. P., Mills, J. L., Molloy, A. M., O'Leary, V. B., Parle-McDermott, A., Scott, J. M., Swanson, D. A. A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the birth defects research group. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 1207-1215, 2000

Bliek BJ, van Schaik RH, van der Heiden IP, Sayed-Tabatabaei FA, van Duijn CM, Steegers EA, Steegers-Theunissen RP; Eurocran Gene-Environment Interaction Group. Maternal medication use, carriership of the ABCB1 3435C > T polymorphism and the risk of a child with cleft lip with or without cleft palate. *Am J Med Genet A.*; 149A(10):2088-92. doi: 10.1002/ajmg.a.33036. 2009

Borst P, Elferink R. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.*; 71:537–592. 2002

Bufalino A, Ribeiro Paranaíba LM, Nascimento de Aquino S, Martelli-Júnior H, Oliveira Swerts MS, Coletta RD. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.** 2010

Callen Df, Baker E, Simmers Rn, Seshadri R & Roninson Ib. Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. **Hum Genet** 77:142-144. 1987.

Castilla E; Camelo-Lopez J. S; PAZ J A E. & ORIOLI I M. Prevención primaria de los defectos congénitos. Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, pp.71-93. 1996.

Castilla EE, Lopez-Camelo JS, Campana H. Altitude as a risk factor for congenital anomalies. *Am J Med Genet.* 1999 Sep 3; 86(1):9-14.

Chauhan PS , Ihsan R , Mishra AK , Yadav DS , Saluja S , V Mittal , Saxena S , S Kapur. High order interactions of xenobiotic metabolizing genes and P53 codon 72 polymorphisms in acute leukemia. *Ambiente Mol Mutagen.* Out; 53 (8):619-30. 2012

Chen B, Hu Y, Jin T, Lu D, Shao M, Zheng L, Wang Q, Shen Y, Liu H, Liu Y, Zhou Y. The influence of metabolic gene polymorphisms on urinary 1-hydroxypyrene concentrations in Chinese coke oven workers. *Sci Total Environ.* Aug 1;381(1-3):38-46. 2007

Chen, H., Sandler, D. P., Taylor, J. A., Shore, D. L., Liu, E., Bloomfield, C. D., Bell, D. A. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet* 347: 295-297, 1996.

Cherry, N., Mackness, M., Durrington, P., Povey, A., Dippnall, M., Smith, T., Mackness, B. Paraoxonase (PON1) polymorphisms in farmers attributing ill health to sheep dip. *Lancet* 359: 763-764, 2002.

Chevrier C, Perret C, Bahuau M, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert-Gnansia E, Cordier S. Fetal and maternal CYP2E1 genotypes and the risk of nonsyndromic oral clefts. *Am J Med Genet A.* Jun 15;143A(12):1382-5. 2007

Clendenning, J. B., Humbert, R., Green, E. D., Wood, C., Traver, D., Furlong, C. E. Structural organization of the human PON1 gene. *Genomics* 35: 586-589, 1996.

Cooper ME, Stone RA, Liu Y-E, HU D-N, Melnick M, Marazita ML. Descriptive epidemiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Shanghai, China, from 1980 to 1989. *Cleft Palate Craniofac J.* 37 (3): 274-80. 2000.

Cole, Toby B., Fisher, Jenna, C., Burbache,r Thomas M., Costa, Lucio G. e Furlong, Clement E.. Neurobehavioral assessment of mice following repeated postnatal exposure to chlorpyrifos-oxon. **Neurotoxicology and Teratology** 34(3): 311–322. , May 2012

Croop JM, Raymond M, Haber D, Devault A, Arceci RJ, Gros P, Housman DE. The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. *Mol Cell Biol.*; 9:1346–50. 1989

da Silva Silveira V , R Canalle , Scrideli CA , Queiroz RG , Bettiol H , Valera ET , Tone LG. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and DNA repair genes and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res.** Jul; 33 (7):898-901. 2009

Das Roy P, Majumder M E Roy B. Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. **Pharmacogenomics** 9:311-321. 2008.

de Aquino SN, Hoshi R, Bagordakis E, Pucciarelli MG, Messetti AC, Moreira H, Bufalino A, Borges A, Rangel AL, Brito LA, Oliveira Swerts MS, Martelli-Junior H,Line SR, Graner E, Reis SR, Passos-Bueno MR, Coletta RD. MTHFR rs2274976 polymorphism is a risk marker for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* doi: 10.1002/bdra.23199. Nov 2013

Desrosiers TA, Lawson CC, Meyer RE, Richardson DB, Daniels JL, Waters MA, et al. National Birth Defect Prevention Study. MaternalOccupational exposure to organic solvents during early pregnancy and risks of neural tube defects and orofacial clefts, **Occup Environ Med.** 69(7):493-9. Jul 2012.

Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., La Du, B. N. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid Res.* 46: 1239-1247, 2005.

Hsu SI, Lothstein L Horwitz SB. Differential overexpression of three mdr gene family members in multidrug-resistant J774.2 mouse cells. Evidence that distinct P-glycoprotein precursors are encoded by unique mdr genes. *J Biol Chem.* 264:12053– 62. 198

Erickson RP. Genes, environment, and orofacial clefting: N-acetyltransferase and folic acid. **J Craniofac Surg.** (21) 1384-7. 2010.

Faria, N.M.X., Fassa, A.G., Facchini, L.A. Pesticides poisoning in Brazil: the official notification system and challenges to conducting epidemiological studies. **Cien Saude Colet**;12,p.25–38, 2007.

Furlong, C. E., Richter, R. J., Seidel, S. L., Motulsky, A. G. Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. *Am. J. Hum. Genet.* 43: 230-238, 1988.

Garcia AM, Fletcher T, Benavides FG, Orts E. Parental agricultural work and selected congenital malformations. *Am J Epidemiol.* Jan 1.1999

Gonçalves, B A de ; Vasconcelos, G M.; Thuler, L C S; Andrade, C, Faro, A; Oliveira, M S. P de-. NQO1 rs1800566 (C609T), PON1 rs662 (Q192R), and PON1 rs854560 (L55M) polymorphisms segregate the risk of childhood acute leukemias according to age range distribution. **Cancer Causes & Control.** Vol23, Issue 11, pp 1811-1819. Nov 2012.

Hanson, J.W. Patterns of abnormal human craniofacial development. In: PRATT R.M.; CHRISTIANSEN R.L. (Ed.) *Current Research Trends in Prenatal Craniofacial Development.* New York: Elsevier North Holland, 1980.

Hassett, C., Robinson, K. B., Beck, N. B., Omiecinski, C. J. The human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1): complete nucleotide sequence and structural characterization. **Genomics** 23: 433-442, 1994.

Hol, F. A., van der Put, N. M. J., Geurds, M. P. A., Heil, S. G., Trijbels, F. J. M., Hamel, B. C. J., Mariman, E. C. M., Blom, H. J. Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects. *Clin. Genet.* 53: 119-125, 1998.

Huang G And Elferink Cj. Multiple mechanisms are involved in Ah receptormediated cell cycle arrest. **Mol Pharmacol.** 67: 88-96. 2005.

Hum, D. W., Bell, A. W., Rozen, R., MacKenzie, R. E. Primary structure of a human trifunctional enzyme: isolation of a cDNA encoding methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. *J. Biol. Chem.* 263: 15946-15950, 1988.

Humbert, R., Adler, D. A., Disteche, C. M., Hassett, C., Omiecinski, C. J., Furlong, C. E. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genet.* 3: 73-76, 1993.

Jacobs H, Dennefeld C, Féret B, Viluksela M, Håkansson H, Mark M, Ghyselinck NB. **Retinoic acid drives aryl hydrocarbon receptor expression and is instrumental to dioxin-induced toxicity during palate development.** *Environ Health Perspect.* 2011 Nov;119(11):1590-5. doi: 10.1289/ehp.1003075. Epub 2011 Aug 1

Jang Jy, Shin S, Choi Bi, Park D, Jeon Jh, Hwang Sy, Kim Jc, Kim Yb, Nahm Ss. Antiteratogenic Effects Of Alpha-Naphthoflavone On 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (Tcdd) Exposed Mice In Utero. **Reprod Toxicol.**;24(3-4):303-9. Nov-Dec 2007.

Johnsrud EK, Koukouritaki SB, Divakaran K, Brunengraber LL, Hines RN, McCarver DG. Human hepatic CYP2E1 expression during development. *J Pharmacol Exp Ther.* Oct;307(1):402-7. 2003

Kayano S, Suzuki Y, Kanno K, Aoki Y, Kure S, Yamada A, Matsubara Y. Significant Association Between Nonsyndromic Oral Clefts And Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (Arnt). **Am J Med Genet A.** 15;130a(1):40-4. Sep 2004.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **J Clin Periodontal.** Jan 24(1): 72-7. 1997.

La Du, B. N. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. (Editorial) **Am. J. Hum. Genet.** 43: 227-229, 1988.

Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reprod Toxicol.*; 12(4):457-63. 1998

Lee, K. A., Kim, S. H., Woo, H. Y., Hong, Y. J., Cho, H. C. Increased frequencies of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) gene deletions in Korean patients with acquired aplastic anemia. **Blood** 98: 3483-3485, 2001.

Lemmen J, Tozakidis Ie, Bele P, Galla Hj. Constitutive Androstane Receptor Upregulates Abcb1 And Abcg2 At The Blood-Brain Barrier After Citco Activation. **Brain Res.** Mar 21;1501: 68-80. 2013.

Lemmen J, Tozakidis Ie, Bele P, Galla Hj. Constitutive Androstane Receptor Upregulates Abcb1 And Abcg2 At The Blood-Brain Barrier After Citco Activation. **Brain Res.** Mar 21;1501: 68-80. 2001.

Lin S, Herdt-Losavio MI, Chapman Br, Munsie Jp, Olshan Af, Druschel Cm. The National Birth Defects Prevention Study. Maternal Occupation And The Risk Of Major Birth Defects: A Follow-Up Analysis From The National Birth Defects Prevention Study. *Int J Hyg Environ Health.* Jun 11. 2012.

Lin S, Herdt-Losavio MI, Chapman Br, Munsie Jp, Olshan Af, Druschel Cm. The National Birth Defects Prevention Study. Maternal Occupation And The Risk Of Major Birth Defects: A Follow-Up Analysis From The National Birth Defects Prevention Study. **Int J Hyg Environ Health** Jun 11. 2012.

Loffredo, L.C.M., Souza, J.M.P., Yunes, J., Et Al. Fissuras Labiopalatais: Estudo Caso-Controle. Ver. **Saúde Pública**, Vol. 28, No 3, P. 213-217. Jun. 1994.

Lofiego, J. L. Fissura Lábio-Palatina: Avaliação, Diagnóstico E Tratamento Fonoaudiológico. Rio De Janeiro: Rev, 1992.

Lopes, N.P.; Queiroz, M.E.L.; Neves, A. A. Influência Da Matéria Orgânica Na Adsorção Do Fungicida Triadimenol Pelo Solo. **Química Nova**, 25 (4): 544-547. 2002.

Martinelli M, Carinci F, Morselli PG, Palmieri A, Girardi A, Farinella F, Baciliero U, Scapoli L. Study of ABCB1 multidrug resistance protein in a common orofacial malformation. *Int J Immunopathol Pharmacol.*; 24(2 Suppl):1-5. 2011

Mccauley LA, Lasarev MR, Higgins G, Rothlein J, Muniz J, Ebbert C, Et Al. Work Characteristics And Pesticide Exposures Among Migrant Agricultural Families: A Community-Based Research Approach. *Environ Health Perspect*; 109:533-8. 2001.

Meirelles, L. C. O Papel Da Anvisa Na Regulação E Controle Dos Agrotóxicos. *Seminário Nacional De Vigilância Do Câncer Ocupacional E Ambiental*. Apresentação Oral. Rio De Janeiro, 2005.

Menegotto, B.C.; Salzano, F.M. Epidemiology Of Oral Clefts In A Large South American Sample. **Cleft Palat Craniofac J.**, Baltimore, V. 28, N. 4, P. 373-376, 1991.

Mills JL, Molloy AM, Parle-McDermott A, Troendle JF, Brody LC, Conley MR, Cox C, Pangilinan F, Orr DJ, Earley M, McKiernan E, Lynn EC, Doyle A, Scott JM, Kirke PNFolate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008.

Mitchell K, Wilson S And Elferink C. The Activated Aryl Hydrocarbon Receptor Synergizes Mitogen-Induced Murine Liver Hyperplasia. **Toxicology**. 276: 103-109. 2010.

Moore, K.L.; Persaud, T.V.N. *Embriologia Clínica*. Rio De Janeiro: Editora Elsevier, 2004.

Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Dziegelewska M, Jagodzinski PP. Associations of folate and choline metabolism gene polymorphisms with orofacial clefts. *J Med Genet*. 2010 Dec;47(12):809-15. doi: 10.1136/jmg.2009.070029. Epub 2009 Sep 7

Mourad, T. A. Adverse Impact Of Insecticides On The Health Of Palestinian Farm Workers In The Gaza Strip: A Hematologic Biomarker Study. **Int J Occup Environhealth**;11:P.144–9, 2005.

Murray Jc. Gene/Environment Causes Of Cleft Lip And/ Or Palate. **Clin Genet**. 61(4): 248-56.2002

Natsume N. Incidence of cleft lip and palate among japanese newborns, 1982 to 1984. **Plast Reconstr Surg**. 79(3): 499-501. Mar1987.

Navab, M., Hama-Levy, S., Van Lenten, B. J., Fonarow, G. C., Cardinez, C. J., Castellani, L. W., Brennan, M.-L., Lusis, A. J., Fogelman, A. M., La Du, B. N. Mildly Oxidized LDL Induces An Increased Apolipoprotein J/Paraoxonase Ratio. *J. Clin. Invest.* 99: 2005-2019, 1997. Note: Erratum: **J. Clin. Invest.** 99: 3043 Only, 1997.

NCBI – National Center For Biotechnology Information. 2013. Disponível Em: <[Http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)>

Nussbaum, R.L. Et Al. Thompson & Thompson Genetics In Medicine. 6. Ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001.

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S. Modulation Of Oestrogen Receptor Signalling By Association With The Activated Dioxin Receptor. **Nature** 423: 545-550, 2003.

Omoumi A, Wang Z, Yeow V, Wu-Chou Yh, Chen Pk, Ruczinski I, Cheng J, Cheah Fs, Lee Cg, Beaty Th, Chong Ss. Fetal Polymorphisms At The Abcb1-Transporter Gene Locus Are Associated With Susceptibility To Non-Syndromic Oral Cleft Malformations. **Eur J Hum Genet.** Feb 27. Doi: 10.1038/Ejhg.2013.25. 2013

Pablo Pinto, Claudio Guedes Salgado, Ney Santos, Dayse O. Alencar, Sidney Santos, Mara H. Hutz, Ândrea Ribeiro-dos-Santos. Polymorphisms in the CYP2E1 and GSTM1 Genes as Possible Protection Factors for Leprosy Patients. *PLoS One.* 2012; 7(10): e47498.

Pablo Conesa-Zamora , Javier Ruiz-Cosano , Daniel Torres-Moreno , Ignacio Español , María Gutiérrez-Meca , Javier Trujillo-Santos , Elena Pérez-Ceballos , Rocío González-Conejero , Javier Corral , Vicente Vicente, e Miguel Pérez-Guillermo. Polymorphisms in xenobiotic metabolizing genes (EPHX1, NQO1 and PON1) in lymphoma susceptibility: a case control study. **BMC Cancer.**; 13: 228. 2013

Pacifici GM, Bencini C, Rane A. Acetyltransferases in humans: Development and tissue distribution. *Pharmacology.* 32:283–91.1986.

Palmieri A, Masiero E, Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Caramelli E, Guidotti L, Carinci F. The MTHFD1 gene is not involved in cleft lip with or without palate onset among the Italian population. *Ann Hum Genet.* 2008 May;72(Pt 3):297-9. doi: 10.1111/j.1469-1809.2007.00428.x. Epub 2008 Jan 6.

Pardridge, W. Drug And Gene Targeting To The Brain With Molecular Trojan Horses. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1. (2010).

Parle-Mcdermott, A., Kirke, P. N., Mills, J. L., Molloy, A. M., Cox, C., O'Leary, V. B., Pangilinan, F., Conley, M., Cleary, L., Brody, L. C., Scott, J. M. Confirmation Of The R653Q Polymorphism Of The Trifunctional C1-Synthase Enzyme As A Maternal Risk For Neural Tube Defects In The Irish Population. *Europ. J. Hum. Genet.* 14: 768-772, 2006.

Parle-Mcdermott, A., Mills, J. L., Kirke, P. N., Cox, C., Signore, C. C., Kirke, S., Molloy, A. M., O'Leary, V. B., Pangilinan, F. J., O'Herlihy, C., Brody, L. C., Scott, J. M. MTHFD1 R653Q Polymorphism Is A Maternal Genetic Risk Factor For Severe Abruptio Placentae. *Am. J. Med. Genet.* 132A: 365-368, 2005.

Pemble, S., Schroeder, K. R., Spencer, S. R., Meyer, D. J., Hallier, E., Bolt, H. M., Ketterer, B., Taylor, J. B. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.* 300: 271-276, 1994.

Pessoa, M.C.P.Y.; Gomes, M.A.F.; Neves, M.C.; Cerdeira, A.L.; Souza, M.D. Identificação de áreas de exposição ao risco de contaminação de águas subterrâneas pelos herbicidas atrazina, diuron e tebutiurn. *Pesticidas: R. Ecotoxicologia e Meio Ambiente*,13: 111-122. 2003.

Peterson-Falzone SJ. Types of cleft and multianomaly craniofacial conditions. *Semin Speech Lang.* 2011.

Poletta FA, Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS. Regional analysis on the occurrence of oral clefts in South America. *Am J Med Genet A.* 2007 Dec 15; 143A(24): 3216-27.

Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcolm S. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. **Hum Genet.** Mar 106(3): 345-50. 2001.

Puga A, Barnes Sj, Dalton Tp, Chang C-Y, Knudsen Es And Maier Ma. Aromatic Hydrocarbon Receptor Interaction With The Retinoblastoma Protein Potentiates Repression Of E2f-Dependent Transcription And Cell Cycle Arrest. **J Biol Chem** 275: 2943-2950. 2000.

Purdue, M.P.; Hoppin, J.A.; Blair, A.; Dosemeci, M.; Alavanja, M.C. Occupational Exposure To Organochlorine Insecticides And Cancer Incidence In The Agricultural Health Study. **International Journal of Cancer**, V. 120, P. 642-649, 2007

Rawles LA, Acuna D, Erickson RP. The role of multiple drug resistance proteins in fetal and/or placental protection against teratogen-induced orofacial clefting. *Mol Reprod Dev.*; 74(11):1483-9. 2000

Reiter R, Brosch S, Ludeke M, Fuschbein E, Haase S, Pickhard A, Et Al. Genetic And Environment Risk Factors For Submucous Cleft Palate. **Eur J Oral Sci.** Apr 120(2):97-103. 2012.

Riordan, J. R., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J., Ling, V. Amplification Of P-Glycoprotein Genes In Multidrug-Resistant Mammalian Cell Lines. **Nature** 316: 817-819, 1985.

Rossit ARB, Cabral IR, Conforti-Froes. Avaliação das frequências alélicas dos genes de biometabolismo de uma população brasileira. **Genetics and Molecular Biology** 22:23,1999.

Rubiś B, Hołysz H, Barczak W, Gryczka R, Łaciński M, Jagielski P, Czernikiewicz A, Półrolniczak A, Wojewoda A, Perz K, Białek P, Morze K, Kanduła Z, Lisiak N, Mrozikiewicz Pm, Grodecka-Gazdecka S, Rybczyńska M. Study Of Abcb1 Polymorphism Frequency In Breast Cancer Patients From Poland. **Pharmacol Rep.**; 64(6):15606. 2012.

Santini Rp, Myrand S, Elferink C And Jr Jjr. Regulation Of Cyp1a1 Induction By Dioxin As A Function Of Cell Cycle Phase. **J Pharmacol Exp Ther.** 29: 718-728. 2001.

Santos Npc, Ribeiro-Rodrigues Em, Ribeiro-Dos-Santos Akc, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro Jf, Zago Ma, Matte C, Hutz Mh, Santos Seb. Assessing Individual Interethnic Admixture

And Population Substructure Using A 48-Insertion-Deletion (Indel) Ancestry-Informative Marker (Aim) Panel. **Human Mutation** 31:184-190. 2010.

Sarmanova J, K Benesova, Gut I, Nedelcheva Kristensen-V, Tynkova L, Soucek P. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. **Hum Mol Genet.**, 01 de junho; 10 (12):1265-73. 2001

Shabbir A, DiStasio S, Zhao J, Cardozo CP, Wolff MS, Caplan AJ. Differential effects of the organochlorine pesticide DDT and its metabolite p,p_-DDE on pglycoprotein activity and expression. *Toxicol Appl Pharmacol*; 203(2):91–98. 2005

Sharma R, Upadhyay G, Siddiqi Nj, Sharma B. Pesticides-induced biochemical alterations in occupational North Indian suburban population. *Hum Exp Toxicol*. 2013 Nov;32(11):1213-27. doi: 10.1177/0960327112474835. Feb 19. Epub 2013

Saxén, I.; Lathi, A. Cleft Lip And Palate In Finland: Incidence, Secular, Seasonal And Geographical Variation. *Teratology*; V. 9, P. 217-23, 1974.

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

Silva, A.B. Evolução Química Das Águas Subterrâneas. *Águas Subterrâneas*, 7. 1994.

Silva, Jandira Maciel Da, Novato-Silva, Eliane, Faria, Horácio Pereira *Et Al*. Agrotóxico E Trabalho: Uma Combinação Perigosa Para A Saúde Do Trabalhador Rural. **Ciência E Saúde Coletiva**, Out./Dez, Vol.10, No.4, P.891-903. 2005

Silveira Vda S, R Canalle, Scrideli CA, Queiroz RG, Tone LG. Role of the CYP2D6, EPHX1, MPO, and NQO1 genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children. **Ambiente Mol Mutagen** Jan; 51 (1) :48-56. . 2010

Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola. *Informações do setor*. Disponível em <www.sindag.com.br>. Acessado em 03/02/2011 www.anvisa.gov.br/toxicologia/informed/informed.htm (acesso em janeiro e fevereiro)

Singh Ms, Micheal M. Role Of Xenobiotic Metabolic Enzymes In Cancer Epidemiology. In: Verma M, Editor. **Cancer Epidemiology**. Vol. 2. New York: Humana Press;. Pp. 243–264. 2009.

Singh S, Kumar V, Vashisht K, Singh P, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Rai A. Role of genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP3A5, CYP2C9, CYP2D6, and PON1 in the modulation of DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. **Toxicol Appl Pharmacol.** 2011.

Singh, N. Sorption behaviour of triazole fungicides in Indian soils and its correlation with soil properties. **J. Agric. Food. Chem.**, 50: 6434-6439. 2002.

Solomon, Gina. *Pesticides And Human Health: A Resource For Health Care Professionals.* California: Physicians For Social Responsibility (Psr) And Californians Pesticide Reform (Cpr), 2000.

Stella Koutros , Gabriella Andreotti , Sonja I. Berndt , Kathryn Hughes Barry , Jay H. Lubin , Jane A. Hoppin , Freya Kamel , Dale P. Sandler , Laurie A. Burdette, Jeffrey Yuenger , Meredith Yeager , Michael CR Alavanja e Laura E. Beane Freeman. Xenobiotic metabolizing gene variants, pesticide use, and risk of prostate cancer. **Pharmacogenet Genomics.** October; 21(10): 615–623. 2011

Tumer TB, Sahin G, ARINC E. Association between polymorphisms of EPHX1 and XRCC1 genes and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Arch Toxicol.** Mar; 86 (3):431-9. 2012

Vieira, E.M.; Prado, A.G.S.; Landgraf, M.D.; Rezende, M.O.O. Estudo da adsorção/desorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. **Química Nova**, 22: 305-308. 1999.

Yamada T, Hirata A, Sasabe E, Yoshimura T, Ohno S, Kitamura N, Yamamoto T. **TCDD disrupts posterior palatogenesis and causes cleft palate.** J Craniomaxillofac Surg. 2013 Apr 17. pii: S1010-5182(13)00039-5. doi: 10.1016/j.jcms..01.024. [Epub ahead of print] 2013

Wang, W.; Guan, P.; Xu, W. Et Al. Risk Factors For Oral Clefts: A Population Based Case-Control Study In Shenyang, China. **Pediatric And Perinatal Epidemiology**, V. 23, P. 310–20, 2009.

Webb G, Vaska V, Coggan M, Board. P "Chromosomal Localization of The Gene For The Human Theta Class Glutathione Transferase (*GSTT1*)". **Genomics** 33 (1): 121 3. Jun 1996.

Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri NE. Genetics Of Nonsyndromic Oral Clefts Revisited. *Cleft Palate Craniofac J.* 33(5): 406-17. Sep 1996.

Wyszynski, D. F. & BEATY, T.H., Review Of The Role Of Potential Teratogens In The Origin Of Human Nonsyndromic Oral Clefts. **Teratology**, 53:309-17. 1996

Zdoukopoulos, N, Zintzaras, E. Genetic Risk Factors For Placental Abruption: A Huge Review And Meta-Analysis. **Epidemiology** 19: 309-323, 2008.

Zeljezic, D. And Gararaj-Vrhnovac, V. Chromosomal Aberration And Single-Cell Electrophoresis (Comet) Assay In The Longitudinal Risk Assessment Of Occupational Exposure To Pesticides. *Mutagenesis*, 16, 359–363, 2001.

ANEXOS

ANEXO I

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS



Carta Provisória: 148/10 CEP-ICS/UFPA

Belém, 10 de novembro de 2010.

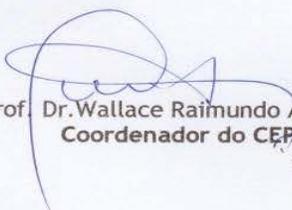
Prof^o Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

Senhor Pesquisador,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa "ESTUDO MOLECULAR DE FISSURAS LABIO-PALATINAS: INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS E MUTAÇÕES EM GENES CANDIDATOS" de CAAE 4879.0.000.073-10 e parecer n^o 140/10 - CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, na reunião do dia 10 de novembro de 2010.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar a este CEP, no dia 13 de setembro de 2012, um relatório indicando qualquer alteração que possa ocorrer após a aprovação do protocolo.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Wallace Raimundo Araujo dos Santos.
Coordenador do CEP-ICS/UFPA

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ manifesto meu consentimento com envolvimento do meu filho/filha no projeto de pesquisa intitulado: **AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES METABOLIZADORES DE XENOBIÓTICOS EM PACIENTES COM FISSURA LABIOPALATINA ATENDIDOS NO ESTADO DO PARÁ.**

1. A natureza e objetivo do projeto de pesquisa, descritos na folha de informação em anexo, foram explicadas a mim. Eu compreendo e concordo em participar.
2. Eu compreendo que meu filho poderá não ter benefício direto por participar do estudo.
3. Eu entendo que os possíveis riscos e/ou efeitos adversos, desconforto e inconveniências, foram explicadas a mim.
4. Eu compreendo que, apesar das informações obtidas no estudo poderem ser publicadas, elas serão confidenciais e meu filho não será identificado a partir delas.
5. Eu compreendo que posso retirar meu filho do estudo em qualquer etapa e que isto não irá afetar os cuidados médicos ou quaisquer outros aspectos da relação recebidos ao meu filho.
6. Eu compreendo que não haverá pagamento para meu filho por participar deste estudo.
7. Eu tive a oportunidade de discutir a participação de meu filho neste projeto de pesquisa com um membro da família ou amigo e/ou tive a oportunidade de ter um membro da família ou amigo presente enquanto o projeto de pesquisa estava sendo explicado pelo pesquisador.
8. Eu estou ciente de que devo guardar uma cópia do Termo de Consentimento, quando completo, e da folha de Informações.
9. Eu concordo que o material (sangue) coletado seja utilizado no projeto acima.

Assinatura do Responsável: _____
Relação de parentesco com o paciente: _____
Nome completo do paciente:
Pesquisador Responsável:
Data: __ / __ / __

