



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

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO USO DE AGROTÓXICOS E DE
POLIMORFISMO DO GENE *GSTT1* NA ETIOLOGIA DE FISSURAS
LABIOPALATAIS EM PACIENTES DO ESTADO DO PARÁ**

CLÁUDIA MARIA DA ROCHA MARTINS

BELÉM
2014



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

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO USO DE AGROTÓXICOS E DE
POLIMORFISMO DO GENE *GSTT1* NA ETIOLOGIA DE FISSURAS
LABIOPALATAIS EM PACIENTES DO ESTADO DO PARÁ**

CLÁUDIA MARIA DA ROCHA MARTINS

Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Neurociência e Biologia
Celular da Universidade Federal
do Pará como requisito para
obtenção de grau de Mestre em
Neurociência e Biologia Celular

BELÉM

2014

CLÁUDIA MARIA DA ROCHA MARTINS

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO USO DE AGROTÓXICOS
DE POLIMORFISMO DO GENE *GSTT1*, NA ETIOLOGIA
DE FISSURAS LABIOPALATAIS EM PACIENTES DO
ESTADO DO PARÁ.**

Dissertação apresentada e aprovada em: 28/08/2010.

Banca Examinadora:

Professor Dr Rommel Burbano

Orientador

Professora Dr Bruna Cláudia Meirelles Khayat

Professor Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M379e Martins, Cláudia Maria da Rocha

Estudo da influência do uso de agrotóxicos de polimorfismo do gene GSTT1, na etiologia de fissuras labiopalatais em pacientes do Estado do Pará / Cláudia Maria da Rocha Martins; orientador, Rommel Burbano. – Belém, 2014.

62 f.

Referências: 46-56.

Dissertação (Mestrado em Neurociência e Biologia Celular) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Biologia Celular, Belém, 2014.

1. Fissuras Labiopalatais 2. Praguicidas/toxicidade 3. Polimorfismo do gene GSTT1. Burbano, Rommel III. Título

CDD-21.ed.: 617.522

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

Simone de Beauvoir

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me amparado sempre.

A minha doce mãe Helena que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida e me ensinou o verdadeiro caminho da vida.

Prof. Dr. Rommel Burbano obrigada por ter sido meu orientador nesta trajetória tão importante.

Ao prof. Dr. Luiz Santana pelo apoio dado durante a pesquisa e dedicação ao estudo junto aos pacientes portadores de Fissuras Orais.

**Ao serviço de Cirurgia Reparadora do Hospital Ophir Loyola ,
Principalmente ao Drº Carlos Bragança**

A Divisão de Fonoaudiologia e a Assistente social Ana de Jesus do Hospital Ophir Loyola.

Aos colegas pesquisadores Danilo Pereira, Maria Elizabeth Santos, Bruna Khayt, Camila Inagaki e Carlos Amaral.

Dra. Iêda Orioli e Flávia Martinês pela dedicação e troca de conhecimentos.

A Mariana, minha filha amiga e companheira que sempre acreditou, e agüentou meus conflitos, obrigada filha.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1.INTRODUÇÃO	14
1.1 CONCEITO DE MÁ FORMAÇÃO CONGÊNITA	16
1.2 EMBRIOLOGIA DA FACE E PALATO	17
1.3 EPIDEMIOLOGIA DAS FISSURAS	20
1.4 CLASSIFICAÇÃO DAS FISSURAS	21
1.5 ASPECTOS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES FONOAUDIOLÓGICAS	
PORTADORES DE FLP	22
1.6 ETIOLOGIA	24
1.6.1 FATORES AMBIENTAIS E FLP	24
1.6.2 IDADE MATERNA E PATERNA	25
1.6.3 EFEITO DO CIGARRO E CARÊNCIA DE ÁCIDO FÓLICO	25
1.6.4 AGROTÓXICOS E SEUS IMPACTOS AO AMBIENTE E A SAÚDE	27
1.6.5 FATORES GENÉTICOS	29
2.AGROTÓXICO E O GEN GSTT1	30
2.1 GENE GSTT1	31
3.OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 AMOSTRA	34
4.2 ASPECTOS ÉTICOS	35
4.3 AVALIAÇÃO FONOAUDIOLÓGICA	35
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA	35
4.5 SELEÇÃO DE ENSAIOS	36
4.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	36
4.7 SNAPSHOT	36
4.8 ESTATÍSTICA	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

5.1 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DE FALA.....	39
5.2 ANÁLISE MOLECULAR	40
6. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

FOFISSURAS ORAIS

FLP FISSURAS LÁBIOPALATAIS

FLFISSURA LABIAL

FPFISSURA LABIO PALATINA

HOL.....HOSPITAL OPHIR LOYOLA

NCBI NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION

PCR POLIMERASE CHAIN REACTION

SAP SHRIMP ALKALINE PHOSFATASE

SINDAG.....SINDICATO NACIONAL DA

INDUSTRIA DE PRODUTOS PARA A DEFESA AGRICOLA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	ESQUEMA ILUSTRANDO A FORMAÇÃO DO LÁBIO E PALATO	15
FIGURA 2	OCORRÊNCIA DE FLP NO ESTADO DO PARÁ	
	POR MESORREGIÃO	17
FIGURA 3	CLASSIFICAÇÃO DAS FISSURAS SEGUNDO SPINNA	18
FIGURA 4	ESQUEMA ILUSTRANDO A POSIÇÃO DO GENE GSTT1 NO	
	CROMOSSOMA 22	28
FIGURA 5	ESQUEMA DA POSIÇÃO DOS EXONS DO GENE GSTT1 NO	
	CROMOSSOMA 22	28
FIGURA 6	LEITURA DA TÉCNICA DE SNAPSHOT	34
FIGURA 7	LEITURA DO PAINEL DE DUAS AMOSTRAS PELA TÉCNICA	
	DE SNAPSHOT	39
GRÁFICO 1	PRINCIPAIS ALTERAÇÕES DE FONEMAS	39
GRÁFICO 2	DADOS DOS PACIENTES QUANTO AO USO DE	
	AGROTÓXICOS	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PRINCIPAIS AGROTÔXICOS	24
TABELA 2	DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DE POLIMORFISMO DO GENE GSTT1	40

RESUMO

Defeito congênito ou malformação congênita 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. No estado do Pará, um grande número de indivíduos acometidos por Fissuras Labiopalatinas são oriundos de zonas rurais, principalmente no nordeste do estado onde sabidamente se faz uso indiscriminado de agrotóxicos nocivos a saúde humana, muitos dos quais tem alto potências teratogênico .O objetivo de nosso estudo foi Investigar a associação entre o polimorfismo (rs4630) no gene *GSTT1* e a exposição a agrotóxicos na etiologia das fissuras lábio palatinas, bem como analisar o padrão das alterações de fala dos pacientes de acordo com o tipo da fissura . Foram analisados 83 pacientes portadores de Fissuras Palatinas, labiais ou Labiopalatinas de ambos os sexos, e 83 mães desses pacientes, todos oriundos do estado do Pará, com residência em zona rural e capital. Foram realizadas análises fonoaudiológicas e com o sangue desses indivíduos foi feita a análise molecular. A análise estatística foi realizada através dos programas estatísticos SPSS v. 12.0 e BioEstat v. 5.0. Os testes realizados foram os testes de Regressão Logística Multipla, teste χ^2 e o teste exato de Fisher. O resultado consiste em cinco análises moleculares diferentes. Constatamos que a presença do alelo C no genótipo dos indivíduos pode influenciar no metabolismo de xenobióticos e aumentar o risco para desenvolver fissuras Orais.

LAVRAS CHAVES: AGROTÓXICOS, MAL FORMAÇÕES, POLIMORFISMOS

ABSTRACT

Birth defect or congenital malformation is any anatomic, metabolic or functional abnormality, inherited by a mechanism of Mendelian transmission or caused by a new mutation, a chromosomal alteration or physical aggression by an infectious, chemical or the fetus or embryo development . Its causes may be genetic or environmental, and, most often, are multifactorial origin, through the genetic predisposition factors interact with environmental factors triggers. In Pará state, a large number of individuals affected by Oral clefts are from rural areas, mainly in the northeastern state where it is notoriously indiscriminate use of pesticides harmful to human health, many of which have high potential teratogenic. The objective of our study was to investigate the association between the polymorphism (rs4630) in the *GSTT1* gene and exposure to pesticides in etiology of oral clefts and analyze the pattern of changes in speech of patients according to the type of cleft. Eight three patients with cleft palate or lip, and of both sexes, and 83 mothers of these patients, all from the state of Pará, residing in rural and capital area were analyzed. Speech therapy and analyzes were performed with the blood of these individuals, the molecular analysis was performed. Statistical analysis was performed using the statistical software SPSS v.. 12.0 and BioEstat v. 5.0. Tests included testing multiple logistic regression test x2e the Fisher exact test. Our result consists of five different molecular analyzes. We found that the presence of the C allele in the genotype of the individual can influence the metabolism of xenobiotics and increase the risk to develop oral clift.

KEY WORDS: AGROTOXIC, POLYMORPHISMS, MALFORMATION

1) INTRODUÇÃO

No século XIX surgiram estudos associando efeitos químicos industriais sobre a reprodução humana, ainda nesta época a alta taxa de infertilidade, abortamento espontâneo, microcefalia, natimortos e convulsões em recém-nascidos, foram registrados em descendentes de trabalhadores de muita parte da Europa (Silva *et al.*, 2006).

Com o desenvolvimento industrial o homem adquiriu uma melhor qualidade de vida, mas paralelo a isso aumentou o risco a exposição a xenobióticos com possíveis níveis acima da capacidade de gerenciamento pelos organismos vivos, possibilitando contaminação ambiental que pouco ocorria até a era industrial.(SINDAG, 2013)

A descoberta de que fatores ambientais poderiam apresentar riscos reprodutivos ocorreu no século XX, com relatos na Europa e Japão, associando um número significativo de recém-nascidos mortos, correlacionando a exposição ambiental de mulheres ao chumbo. A partir destas descobertas surgiram dados de efeitos de radiação ionizante em 1920, de rubéola em 1941, aminopterina em 1952 e os primeiros relatos de malformação em humanos por condições ambientais devido a contaminação de peixes na Bahia Minamatano Japão pelo metilmercurio em 1950.(Wyszynski *et al.*,1996).

Atualmente existem substâncias já conhecidas e estudadas quanto ao potencial tóxico sobre o sistema reprodutor. Ensaio em roedores apresentaram associações positivas para má formação com fissuras orais (FO) (Thomas *et al.*, 2004)

Qualquer fator ou condição ambiental que afete a capacidade de gerar crianças em condições perfeitas de saúde, ou seja, hígdas, é considerado como risco a

reprodução, a radiação, tabaco e uso de drogas são alguns exemplos de risco na reprodução (Romitti *et al.*, 1999).

Tanto o homem quanto a mulher podem estar expostos a fatores de riscos e qualquer um dos dois podem apresentar alterações no nível do aparelho reprodutor consequentemente gerar uma prole comprometida (Carinci *et al.* 2007).

Dentre os países que apresentam um maior numero do uso de agrotóxicos o Brasil lidera com um significativo percentual de trabalhadores em área rural expostos a estes compostos, existindo assim uma gama de produtos em diferentes composições e apresentações. O uso de agrotóxico está entre os maiores fatores de risco para a saúde humana e para o meio ambiente (Brasil *et al.*, 2004).

A utilização de inseticidas, fungicidas e herbicidas é realizada na agricultura desde a década de 1940, tais substancias são produzidas para serem tóxicas em determinados organismos e os indícios de serem teratogênicas, carcinogênicas e/ ou mutagênicas em seres vivos ainda são pouco estudados, existe portanto, pouca atenção aos seus efeitos na saúde humana(Vieira *et al.*, 1999).

O estudo de Garçia e colaboradores demonstrou que a exposição de mulheres em período gestacional nos primeiros trimestres a estes agentes em áreas rurais poderia está associado ao aparecimento de riscos congênitos, considerando a exposição do trabalho materno em zonas rurais, trabalho com jardinagem e moradia em área de plantio, contudo, como estudos ecológicos, não podemos generalizar, mas os efeitos desta exposição são consideráveis em aparecimento a fissuras labiopalatinas.(Garçia *etal.*,1991)

Considerando a existência desta população residente em zona rural e exercendo atividades em áreas de plantio onde o uso de agrotóxicos é utilizado, fez com que ocorresse a necessidade de estudar possíveis características genéticas que venham influenciar no metabolismo dos compostos e investigar se ocorrem variantes polimórficas e se estas estão associados em mecanismos teratogênicos e especificamente na gênese da fissura labiopalatina. (Faria *et al*, 2007).

Contemplando estas investigações decidiu-se estudar a hipótese do polimorfismo do Gene *GSTT1*(polimorfismos4630), se este apresenta associação xenobiótica e biometabólica de fatores relacionados a fissuras labiopalatinas (FLP).

1.1) CONCEITOS DE MÁFORMAÇÃO CONGÊNITA

Defeito congênito ou máformação congênita 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).

As malformações congênitas e defeitos de nascimento são termos descritos na literatura usados para descrever distúrbios estruturais que aparecem no nascimento. Malformações geralmente ocorrem durante a formação de estruturas no período da organogênese, pode resultar da ausência total ou parcial de uma estrutura ou em alterações na configuração normal. As malformações geralmente são causadas por fatores ambientais e/ou genéticos, agindo de modo independente ou em conjunto. Sendo que a maioria das máformação tem sua origem no período entre a terceira e a oitava semana de gestação. As fissuras labiopalatinas (FLP) não sindrômicas tem origem multifatorial, podendo haver predisposição genética com vários genes envolvidos e vários fatores ambientais que podem atuar durante o desenvolvimento embrionário vindo a manifestar-se as FLP (Munger *et al.*, 1996).

Os danos causados pelas FLP vão desde distúrbios emocionais a até mesmo sociais, afetando a família e a sociedade, assim como, a vida profissional destes pacientes, o tratamento exige o envolvimento de uma equipe multiprofissional. Embora ainda não haja como prevenir o nascimento de pessoas com malformação craniofacial congênita, a integração a um serviço especializado permitirá o monitoramento multidisciplinar, além de favorecer o convívio social dos portadores de anomalias (Stupia, *et al.*, 2011.)

1.2) EMBRIOLOGIA DA FACE E PALATO

O desenvolvimento inicial da face é dominado pela proliferação e migração do ectomesênquima envolvido na formação das cavidades nasais primitivas. Em torno do 28º dia de vida intra-uterina, espessamentos localizados desenvolvem-se no ectoderma da proeminência frontal em posição rostral à abertura do estomódio. Tais espessamentos

são placóides olfatórios. Uma rápida proliferação do mesênquima subjacente ocorre em torno das saliências dos placóides na proeminência frontal anterior, produzindo, também, uma saliência em forma de ferradura, que transforma o placóide olfatório em uma fosseta nasal. O braço lateral de cada ferradura é chamado processo nasal lateral, e o braço medial processo nasal medial. Entre os dois processos nasais, encontra-se uma nova área formada por uma depressão, denominada processo frontonasal. Os processos nasais mediais dos dois lados, junto com o processo frontonasal, formam a porção média do nariz, porção média do lábio superior, porção anterior da maxila e palato primário. Os processos maxilares crescem medialmente e se aproximam dos processos nasais mediais e laterais, porém permanecem separados deles por nítidos sulcos. O crescimento medial do processo maxilar empurra o processo nasal medial em direção a linha média, onde se funde com a sua contraparte anatômica do lado oposto, eliminando o processo frontonasal. Dessa forma, o lábio superior é formado a partir dos processos maxilares e processos nasais mediais, ocorrendo fusão entre a extensão anterior do processo maxilar e a face lateral do processo nasal medial. O lábio inferior é formado pela fusão dos processos mandibulares. A fusão dos dois processos nasais mediais resulta na formação de parte da maxila, que contém os dentes incisivos e o palato primário, assim como parte dos lábios (Baroneza *et al.*, 2005).

Um tipo incomum de fusão ocorre entre o processo maxilar e o processo nasal lateral. Como a maioria dos outros processos associados ao desenvolvimento facial, os processos maxilares e nasais laterais são, inicialmente, separados por um sulco profundo. O epitélio do assoalho do sulco entre eles formam um núcleo sólido que se separa da superfície e, finalmente, dá origem a um canal, para formar o ducto nasolacrimal. Após o ducto tornar-se separado os dois processos fundem-se em decorrência da proliferação do mesênquima. As fissuras possuem diferentes causas, as

fendas do lábio e da maxila anterior resultam de um desenvolvimento imperfeito do palato embrionário primário. Frequentemente, quando essas fendas ocorrem, a deformação do desenvolvimento facial impede o contato das cristas palatinas, quando elas giram para a posição horizontal, de tal forma que as fendas do palato primário são acompanhadas pelas do palato secundário (duro e mole). Entretanto, as FLP podem resultar de falhas das cristas palatinas de se contatarem por causa de uma falha de crescimento ou de um distúrbio no mecanismo de elevação das cristas; falhas das cristas em se fundirem após o contato ter sido estabelecido devido ao fato de o epitélio de revestimento não se romper ou não ser reabsorvido; ruptura após ter ocorrido à fusão das cristas; fusão e consolidação defeituosa do mesênquima das cristas palatinas (Lettieri, 1983)

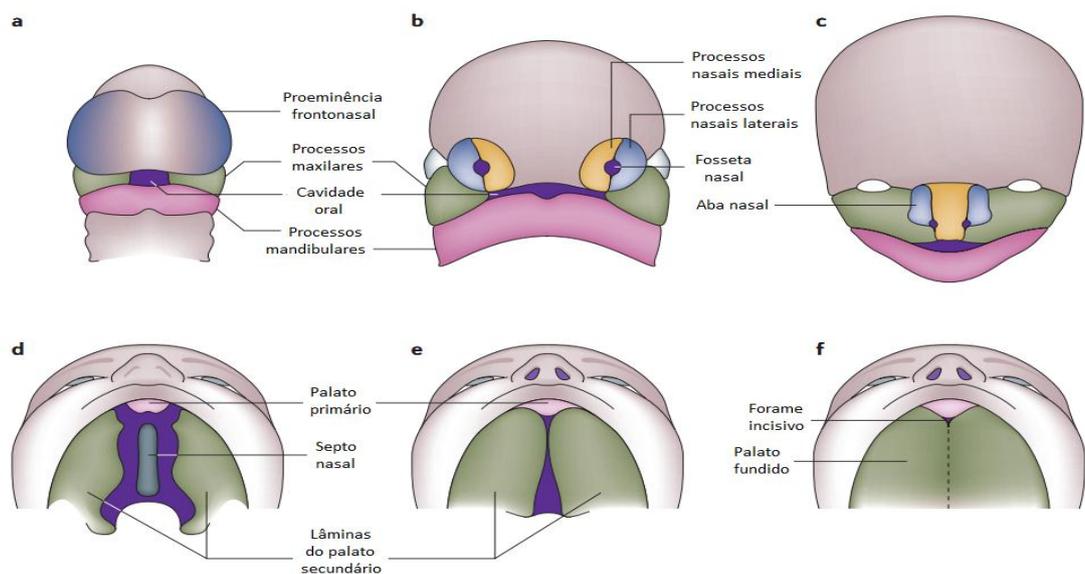


Figura 1- Esquema da formação do lábio e palato.

Fonte : Dixon *et al.*, (2011)

a) Proeminência frontonasal, processos maxilares e processos mandibulares circundando a cavidade oral na 4ª semana do desenvolvimento embrionário. b) Por volta

da 5ª semana, a fosseta nasal é formada, além dos processos nasais laterais e mediais. c) Processos nasais mediais fundem-se com os maxilares para a formação do lábio superior e palato primário no fim da 6ª semana. Os processos nasais laterais formam as abas nasais, e os mandibulares formam a mandíbula. d) Na 6ª semana, o palato secundário se desenvolve a partir dos processos maxilares, que crescem verticalmente. e) As lâminas palatinas elevam-se para uma posição horizontal acima da língua e encostam uma na outra, iniciando a fusão. f) A fusão completa das lâminas palatinas divide completamente as cavidades oral e nasal.

1.3) EPIDEMIOLOGIA DAS FISSURAS

As FLP variam de um indivíduo para cada 700 nascidos vivos. O primeiro pesquisador a estudar a prevalência das fissuras foi Frobelius, onde encontrou 118 casos entre 180.000 crianças (0,7/100 crianças) em São Petersburgo entre 1883 á 1864. Contudo, existem informações que mostram que há grandes diferenças étnicas na incidência. As FLP são comuns em aborígenes americanos (3,7/1000 nascidos vivos) e, a seguir, em ordem decrescente de frequência os japoneses (2,7/1000), chineses (2,0/1000) e negros (0,4/1000). (Singh, 2009).

Estima-se que no mundo haja um caso de FLP a cada 700 nascidos vivos, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). As fissuras podem ocorrer isoladas ou fazer parte de síndromes associadas, portanto, há necessidade minuciosa de investigação em busca de outras anormalidades (Castilla *et al.*, 1996).

Visto que boa parte da população do norte do Brasil é rural e sua principal atividade de trabalho envolve a utilização de agrotóxicos, o que nos faz perceber da 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 das FLP (Pessoa *et al.*, 2003).

No Brasil existem discrepâncias regionais evidentes, observa-se baixa incidência no Norte e Nordeste, fato este que pode ser atribuído às falhas de notificações dos casos.(Carreirão *et al.*, 1996).

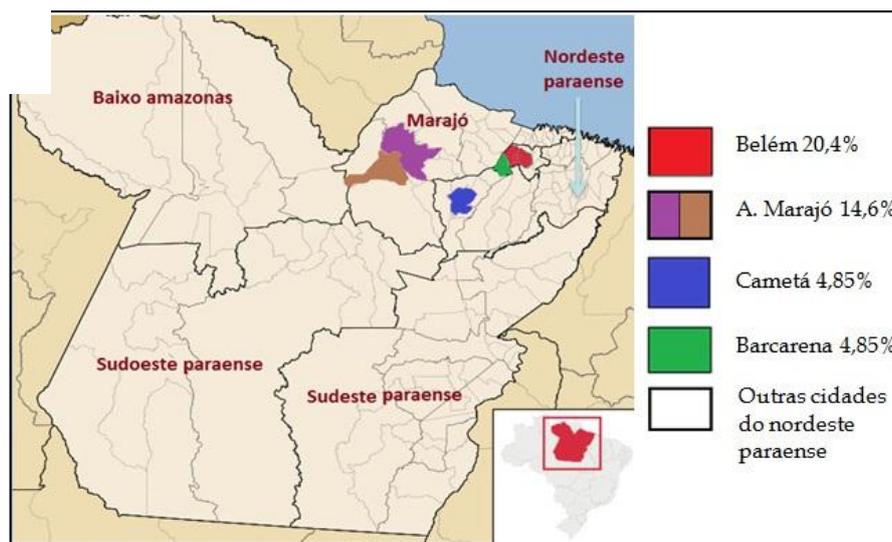


Figura 2- Ocorrências de FLP no estado do Pará, por mesorregiões.

.Fonte: Prontuários Analisados no HOL/2013

1.4) CLASSIFICAÇÃO DAS FISSURAS

Foram descritas várias classificações das FLP com a finalidade de diferenciá-las com simplicidade e objetividade. Na literatura mundial são evidenciadas inúmeras classificações. No Brasil, uma das mais difundidas, atualmente, é de Spina (1979) que é prática e eficaz, onde o forame incisivo divide a origem embrionária das estruturas do palato em si daqueles da pré-maxila, assim as estruturas que envolvem o lábio e o alvéolo dentário, bem como a porção anterior do palato duro, são classificadas em fissuras pré-forame, e podem ser uni ou bilaterais. As fissuras pós-forame incisivo,

envolvem o restante do palato. As fissuras que envolvem ambas as regiões, pré e pós-forame incisivo são chamadas de transforame (Murray, 2002).

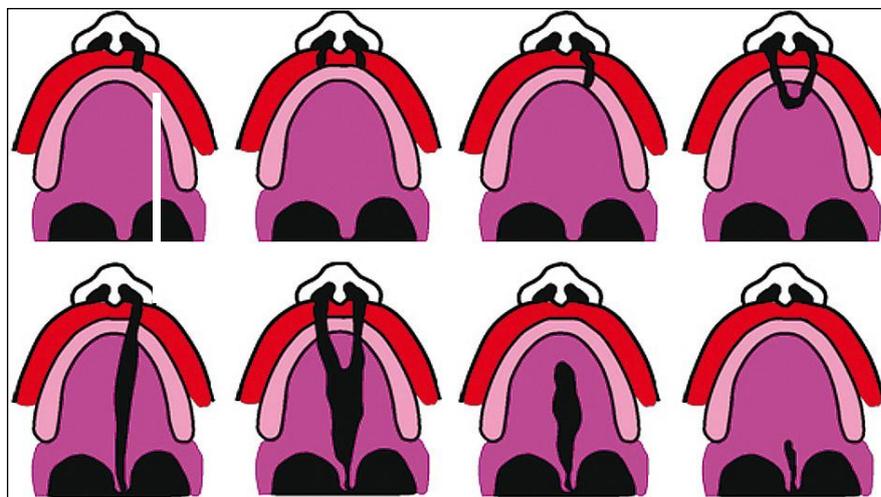


Figura 3: Classificação das Fissuras Segundo Spina

et al, 1979

Fonte: Scielo

1.5) ASPECTOS CLINICOS E ALTERAÇÕES FONOAUDIOLÓGICAS MAIS FREQUENTES EM PORTADORES DE FLP.

Modificações anatômicas na região peri e intra bucal decorrente de fendas de lábio e palato com comunicação da cavidade nasal e bucal, acometem dificuldades na habilidade de sucção efetiva no recém nascido. O ato de sugar débil, no recém nascido acarreta fadiga, irritabilidade, fome, engasgos e regurgitação nasal do alimento e futuros danos na fala e voz do individuo, resultando nas alterações do distúrbio da comunicação humana ainda na infância com repercussão até a fase adulta. (Altmann *et al.*, 1994).

A anatomia das vias aéreas superiores na presença de FLP apresentam o modo respiratório nasal, onde a mesma encontra-se dificultosa, transformando o indivíduo com FLP em respirador oral em potencial (Capelozza *et al.*,1992). A presença da FLP carrega comprometimentos otológicos que podem ocasionar perdas auditivas, infecções de repetição e irritação da tuba auditiva por refluxo de leite e alimentos, assim como amigdalites e adenoides hipertrofiadas. Portanto as crianças que apresentam tem riscos elevados de adquirir infecções de repetição no ouvido, podendo posteriormente até a perder a audição se não tratada precocemente (Baroneza *et al.*, 2005).

As anormalidades estruturais do lábio, processo alveolar e do palato constituem obstáculos para a correta fonoarticulação dos sons da fala, bem como a qualidade vocal que pode apresentar-se anasalada. As possíveis falhas articulatórias apresentam-se na função da amplitude e da estesia do palato e arco dentário superior Silva,(1992). Os fonemas alterados, geralmente, são os bilabiais /p//b/; os velares (golpe de glote) /k//g//c/e os fricativos faríngeas /f/ e /v/.(Lofiego,1992)

O ponto articulatório decorrente ora do vedamento labial, ora da ausência do fechamento do palato. O termo “fala de fenda palatina” tem sido usado para descrever uma gama crescente de fenômenos, tais como, ressonância nasal anormal, qualidade alterada da voz, laríngea, produção atípicas de consoantes (Trindade *et al.*, 1996).

A fonação sempre estará alterada, assim como, a qualidade da voz laríngea, que via de regra, é associada á fala de portadores de fendas palatinas. São presentes também na história clínica a rouquidão e volume reduzido vocal (Loffredo *et al.*,1994) .

Alguns problemas dentários bem evidentes nos pacientes com FLP são: agenesia de dentes adjacentes à fissura, com mais ocorrência nos incisivos laterais permanentes; ausência de dentes em outras regiões, especialmente os pré-molares, em alta incidência;

dentes mal formados, posicionados ectopicamente; dentes supranumerários; falta de suporte ósseo para alguns dentes, comprometendo a possibilidade de movimentá-los para a posição desejável (Mills *et al.*,2008).

O tratamento fonoaudiólogo inicia-se imediatamente ao diagnóstico precoce na maternidade, nesta etapa orientamos os pais e equipe de enfermagem sobre a alimentação do bebê. Os aspectos nesta fase mais importantes são: Posição do lactente durante as mamadas, onde ele ficará o mais vertical possível, para possíveis regurgitamentos do leite para a cavidade nasal, tipo de mamadeira, aconselhamos com bico e chupeta ortodôntico para adequada sucção evitando possíveis transtornos de deglutição na fase de lactação .(Altmann *et al.*,1994)

As cirurgias são realizadas pela equipe liderada por um cirurgião plástico a partir dos 3 meses de vida, iniciando com a QUEILOPLASTIA (cirurgia de lábios), PALATOPLASTIA (cirurgia de palato) por volta dos 12-18 meses de vida. Após o crescimento facial completo por volta dos 14-16 anos, são realizadas as cirurgias ALVEOLARES (gengiva). A RINOSSEPTOMIA após o total crescimento facial. (Garlin *et al.*,2001).

1.6) ETIOLOGIA

1.6.1) Fatores ambientais e FLP

Dados epidemiológicos e experimentais sugerem que fatores ambientais podem ser importantes na etiologia das FLP. Exposição materna ao cigarro e/ou álcool, nutrição inadequada, infecções virais, drogas medicinais e teratogênicos no local de trabalho e em casa no início da gravidez, tem sido investigados (Mossey *et al.*, 2007); (Chen *et al.*, 2007).

Alguns teratogênicos são reconhecidos por estarem associados a fissuras, incluindo agentes raros como fenitoína, ácido valproíco e talidomida (Wyszynski *et al.*,1996).Em função do contato

direto com agrotóxicos, Garcia e colaboradores (1991) 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.

1.6.2) Idade materna e idade paterna

Muitos estudos têm relacionados um aumento do risco de fissuras com o aumento da idade materna ,Contudo muitos estudos falharam em identificar o aumento da idade maternal com um aumento no risco de fissuras. Reciprocamente, outros estudos encontraram um aumento do risco de fissuras labiais e mães jovens Deroo,(2003); Reefhuis,(2004).

A idade paterna avançada está relacionada com o aumento de mutações e aberrações no DNA do espermatozoide, Puscheck,(2007) Sartorelli(2001). Mudanças genéticas nos espermatozoides de pais com idade avançada poderiam levar a um risco aumentado de defeitos congênitos em recém nascidos. Estudos prévios encontraram encontrado associações entre idades paternas avançadas e muitos defeitos em crianças nascidas, incluindo fissuras palatinas Harville(2007).

1.6.3) Efeito do cigarro e carência de ácido fólico

O uso de cigarro durante a gestação e o consumo de ácido fólico são os dois principais fatores em investigação que parecem modificar os riscos genéticos de FLP. Os efeitos do uso do cigarro durante a gestação estão associados com o aumentam do risco de recém-nascidos apresentarem FLP (Ribeiro *et al.*,2007). Estudos sugerem que a fração

atribuível ao uso do cigarro pelas mães durante a gestação contribui com 4% do total de casos das fissuras labiais e palatinas, e com 12% de fissuras labiais e palatinas bilaterais (Honein *et al.*, 2007).

Outros estudos têm investigado o efeito do fumo passivo e o risco de FLP (Yang *et al.*, 1996). O risco de FLP associado ao fumo passivo tende a aumentar tanto em recém nascidos do gênero masculino quanto do gênero feminino (Zhiwen *et al.*, (2010). (Romitti *et al.* 1999) sugerem um maior efeito do tabagismo passivo em recém nascidos do gênero masculino. Contudo (Little *et al.*, 2004)encontraram que o risco de FLP associados ao tabagismo passivo é maior em recém-nascidos do gênero feminino. (Honein *et al.* 2007) sugerem que os efeitos são iguais tanto para ambos os gêneros.

O tabagismo durante a gestação é a principal causa de hipóxia embrionária, e tem sido associada com o aumento da incidência de FLP não sindrômicas. No entanto essa relação não é um consenso entre os pesquisadores. Estudos de meta-análises sugerem uma pequena, mas estatisticamente significativa associação entre o uso do cigarro durante o primeiro trimestre de gestação e o aumento do risco em crianças com FLP ou FL. (Wyszynski *et al.*, 1997).

O consumo associado do álcool com o tabaco, de acordo com (Romitti *et al.* 1999), pode resultar em um aumento mais acentuado no risco de fissura oral.

A carência de ácido fólico no organismo parece ter relação com casos de FLP uma vez que suplementos de ácido fólico diminuem o risco de recém-nascidos nascerem com FLP em um terço (Wilcox *et al.*, 2007).

Já foi bem estabelecido que o ácido fólico previne defeitos no tubo neural devido o mesênquima facial ser derivado da crista neural, e acredita-se que as células da crista neural

são importantes para o fechamento do tubo neural. O uso periconcepcional de ácido fólico também pode reduzir o risco de FLP (Hartridge.*et al.*, 1999).

1.6.4) AGROTÓXICOS E SEUS IMPACTOS AO AMBIENTE E A SAÚDE

O trabalho na agricultura já é exercido pelo homem há mais de dez mil anos, quanto que o uso de agrotóxicos para o controle de diversas pragas e doenças na lavoura já é descrito por meio século (Silva *et al.*, 2006).

O Brasil nos últimos 10 anos, às vendas de agrotóxicos saltaram assustadamente assumindo o país a posição triste de maior consumidor mundial de venenos. Em 2009 o consumo ultrapassou a marca de 1 milhão de toneladas, o que representa 5,2 Kg de veneno por habitante, segundo os dados do SINDAG (Sindicato Nacional da Industria de Produtos para Defesa Agrícola)2014. Existe no Brasil atualmente 366 ingredientes ativos registrados no Brasil para uso agrícola, pertencentes a mais de 200 grupos clínicos diferentes que dão a 1.458 produtos formulados para venda no mercado.,são Inseticidas, fungicidas, reguladores e inibidores de crescimento. Os Herbecidas sozinhos representam(48%) deste mercado, seguidos pelos inseticidas (25%) e pelos Fungicidas (22%) (Pessoa *et al*, 2003).

O Herbecída Glifosato (mata/mato) mais vendido no Brasil e no mundo, é comercializado sob a marca *Roundup*, tornou-se popular no Brasil que é usado erradamente em jardins domésticos. Uma pesquisa realizada pela equipe do Professor Andrés Carrasco, chefe do laboratório de Embriologia Molecular da Universidade de Buenos Aires, na Argentina, onde foi avaliado os possíveis efeitos do glifosato em embriões *de anfíbios*, após 30 meses confirmou-se que o glifosato pode provocar deformações nos embriões mesmo em concentrações até 5 mil vezes menores do que as do produto comercial .Os efeitos descritos no artigo incluem **microftalmia** (olhos menores que o normal), **microcefalia**

(cabeças pequenas e deformadas), **ciclopia**(um olho só, no meio do rosto) e **malformações craniofaciais**(deformação de cartilagens faciais e cranianas) (Silva *et al.*,2006).

Em estudos realizados com usuários de agrotóxicos em áreas rurais, lojas especializadas, agrônomos, outros pesquisadores e sites governamentais observou-se que os produtos mais utilizados como agrotóxicos são:

Herbicidas	Fungicidas	Pesticidas
Glifosato Paraquat	Cerconil Mancozeb Imidazol Diabendazol	Deltametrina Organofosforados DDE

Tabela 1 - Principais agrotóxicos

Fonte: Formulário Sindag : 2003

1.6.5) FATORES GENÉTICOS

Formas sindrômicas de FLP são, em muitos casos, devido às aberrações cromossômicas ou doenças monogênicas, enquanto que a não sindrômicas são derivadas da interação de fatores genéticos com os fatores ambientais (Stuppia, *et al.*, 2011).

Pelo fato da etiologia das FLP não sindrômicas ser multifatorial, ainda não existe fatores específicos e isolados que geram a FLP. Além disso, uma variedade de métodos de investigações genéticas e epidemiológicas tem identificado vários genes e loci candidatos associados à esse tipo de malformação facial (Chiquet *et al.*, 2008).

Os produtos dos genes envolvidos na etiologia das FLP são classificados dentro de algumas categorias à exemplo de: sinalizadores de polarização, fatores de crescimento e recepção, fatores de transcrição, moléculas de aderência celular e matriz extracelular (Cooper *et al.*, 2000).

A presença de mais de um caso de FLP em indivíduos da mesma família em diversas populações sugere que fatores genéticos determinam um papel importante na etiologia desses defeitos (Carinci *et al.* 2007).

Análises de segregação e estudos epidemiológicos mostraram que 25% a 35% dos pacientes com FLP e 10% a 20% dos pacientes com fissura palatina têm histórico familiar de FLP. Considerando este fato, um simples modelo de herança mendeliana é insuficiente para explicar o modo de herança nessas famílias (Wyszynski *et al.*, 1996).

Para identificar genes envolvidos na etiologia das FLP, associações e estratégias de ligação para avaliar genes candidatos têm sido propostas, focalizando primariamente FLP (Murray, 1995; Wyszynski *et al.*, 1996).

Baseado em estudos de ligação e associação, vários genes parecem influenciar o risco de FLP, porém tem sido difícil reproduzir os resultados quando se analisa diferentes populações (Marazita *et al.*, 2002).

Uma abordagem para estudar a genética das FLP é avaliar genes e seus polimorfismos conhecidos por controlar síndromes que envolvem malformações, e entre elas, especialmente aquelas fenotipicamente mais próximas das FLPS não sindrômicas. Tais genes e polimorfismos podem servir como ponto de partida para desvendar variantes genéticas que controlam o risco para esse tipo de fissuras não sindrômicas (Parle *et al.*, 2006).

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 sequência de aminoácidos da proteína final), na homologia com modelos animais ou previamente associados com patologias e alterações do desenvolvimento (Prescott *et al.*, 2001).

2 AGROTÓXICOS E O GENE *GSTT1*

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, as mães devem tomar atitudes para proteção de seus fetos devem se proteger destes elementos no intuito de prevenir defeitos no desenvolvimento, incluindo a formação de FLP (Reefhuis *et al.*, 2004).

Shi *et al.*, 2007 demonstraram que existe uma alta expressão de *GSTT1* em tecido

embrionário craniofacial, durante um bom período do desenvolvimento, podendo assim a falha deste gene, influenciar entre outras coisas o aparecimento de FLP.

Estudos demonstram 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 (Saxén *et al.*, 1974).

A proteína *gstt1* atua na conjugação de uma glutatona reduzida em vários compostos hidrofóbicos e eletrofílicos. Alguns destes compostos, como o paraquat, podem induzir um aumento da expressão do mRNA de *GSTT1*, assim infere-se a necessidade deste produto gênico para a metabolização destes compostos químicos. (Lee *et al.*2001).

2.1 GENE *GSTT1*

A glutatona-S-transferase (*GST*) teta 1 (*GSTT1*) é um membro de uma superfamília de proteínas que catalisam a conjugação de glutatona reduzida a uma variedade de compostos eletrofílicos e hidrofóbicos. *GSTs* humanos podem ser divididos em cinco classes principais: alfa, mu, pi, theta e zeta. A classe theta inclui *GSTT1* e *GSTT2*(Masood *et al.*, 2013).

O gene *GSTT1*, está localizado no cromossomo 22 na região 22q11, está localizado a aproximadamente 50 kb de distancia a partir do gene *GSTT2* e estes dois genes possuem uma estrutura semelhante, compostos por . O gene *GSTT1* produz uma proteína de resíduos

de aminoácidos, envolvida no biometabolismo de xenobióticos e de fatores relacionados à FLP (Abhishek *et al.*, 2010).

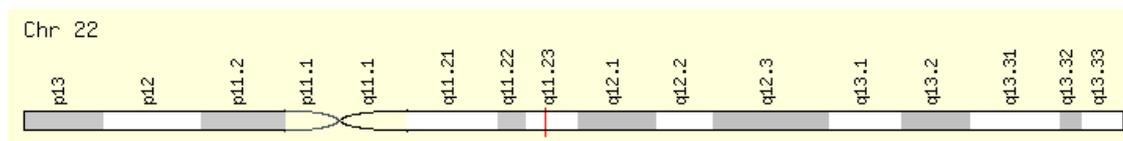


Figura 4 - Posição do gene *GSTT1* no cromossomo 22.

Fonte: Genecards, 2013

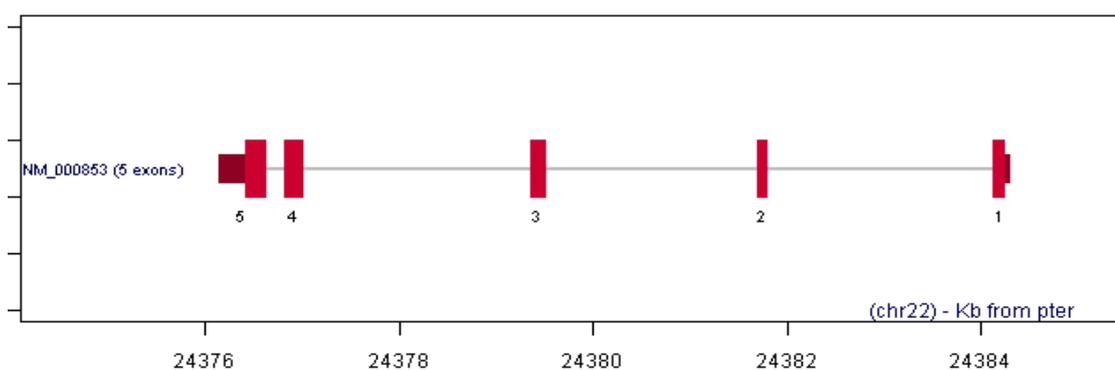


Figura 5 - Posição dos éxons do Gene *GSTT1* no cromossomo 22

Fonte: Atlasgeneticsoncology, 2013

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Muitas são as deficiências a serem resolvidas no campo da saúde, a carência de serviços especializados para indivíduos com FLP no Brasil é apenas uma das necessidades a serem atendidas. A incompatibilidade entre a procura e a capacidade de atendimento oferecida aos pacientes com FLP é fato inquestionável. A criação de novos centros especializados por meio de associações de hospitais e universidades pode melhorar o caminho para um melhor atendimento a estes pacientes no estado do Pará, assim como no Brasil.

No estado do Pará, um grande número de indivíduos acometidos por FLP são oriundos de zonas rurais, principalmente no nordeste do estado onde sabidamente se faz uso indiscriminado de agrotóxicos nocivos a saúde humana, muitos dos quais tem alto potencial teratogênico comuns (Pradat *et al.*, 2003; Vanrooijet *et al.*, 2004; Bille *et al.*, 2007; Honein *et al.*, 2007; Wilcox *et al.*, 2007; Deroo *et al.*, 2008; Dolk *et al.*, 2008).

Assim, o estudo do gene *GSTT1* investigou se existe correlação entre a exposição a fatores químicos nocivos, principalmente agrotóxicos, interagindo com sua variante polimórfica na etiologia das FLP. Com base nesse estudo poderemos observar se existe influência da exposição a agrotóxicos na origem e na epidemiologia deste tipo de má formação congênita, assim como, detectar os principais fonemas alterados nos pacientes estudados.

3) OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre o polimorfismo (rs4630) no gene *GSTT1* e a exposição a agrotóxicos na etiologia das FLPS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a prevalência de cada tipo de fissura oral em indivíduos expostos e não expostos a agrotóxicos.
- Avaliar se há diferença nas frequências alélicas e genotípica da variante rs4630 do gene *GSTT1* em indivíduos portadores de FLP, cujas mães foram expostas a agrotóxicos.
- Avaliar se há diferenças nas frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo no gene *GSTT1* entre as mães expostas a agrotóxicos e filhos afetados.

- Correlacionar as variantes alélicas e genotípicas do polimorfismo no gene *GSTT1* do probando e seus respectivos aspectos clínicos de fissuras.
- Análise das alterações da fala em pacientes portadores de FLP atendidos no HOL.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 AMOSTRA

Este estudo foi composto por uma amostra de 83 pacientes afetados por Fissuras labiais, palatais ou labiopalatas de ambos os sexos, e 83 mães desses pacientes, todos oriundos do estado do Pará, com residência em zona rural e capital. Foram realizadas análises fonoaudiológicas e com o sangue desses indivíduos foi feita a análise molecular.

Em relação aos aspectos clínicos, foram observados os diferentes tipos de fissuras. O critério de exclusão utilizado na pesquisa foi à presença de outras síndromes associadas às Fissuras Lábiopalatinas, quando possível.

O estudo iniciou-se em rotina ambulatorial no setor de fonoaudiologia do Hospital Ophir Loyola através de contato individual com cada paciente ou responsável, foram fornecidas aos participantes informações acerca do objetivo da pesquisa, além de um formulário (termo de livre esclarecimento) para assinatura e consentimento para posterior coleta do material (anexo B).

Um questionário foi aplicado visando observar várias características sócio-ambientais, onde as genitoras dos pacientes foram arguidas sobre hábitos tabagistas e etilistas, além do nível de exposição a agrotóxicos ou outros compostos que tinham potencial teratogênico (anexo D).

4.2) ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa está de acordo com os princípios éticos básicos das diretrizes e normas que regulamenta pesquisas em seres humanos: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça. Durante o estudo foi realizado um contato prévio com cada paciente ou responsável durante as consultas de rotina no ambulatório do Hospital Ophir Loyola (HOL), onde foram fornecidas informações acerca do objetivo da pesquisa, riscos e benefícios ao paciente, familiares e população afetada, além de ter sido entregue um formulário para assinatura do termo de livre esclarecimento e consentimento para posterior coleta do material. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciência da Saúde (ICS) da Universidade Federal do Pará (UFPA) N° 140/10 (Anexo A).

Considerando que a pesquisa é de caráter analítico, os pacientes e familiares não foram expostos a nenhum risco maior. O material biológico colhido (sangue periférico) foi obtido por procedimento pouco invasivo (punção venosa periférica) dentro do ambulatório do HOL.

4.3) AVALIAÇÃO FONOAUDILÓGICA

Quanto às análises fonoaudiológicas foram realizadas reavaliações durante o retorno dos pacientes em protocolo já estabelecido no ambulatório do HOL e registrados no prontuário individualizado do paciente. Foram analisados os principais fonemas alterados e padrões articulatórios inadequados, em seguida registrou-se em protocolo avaliativo (Anexo C) de rotina do ambulatório do hospital Ophir Loyola (HOL) no setor de fonoaudiologia.

4.4)EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi a partir das amostras de sangue periférico, foram realizadas com o kit de extração **Invirsob spin blood mini kit (Invitek)**, o DNA extraído foi extraído

e armazenado em freezer -20°C até o momento da amplificação dos fragmentos por PCR (Polimerase Chain Reaction).

4.5) SELEÇÃO DE ENSAIOS

Os marcadores foram previamente selecionados a partir da análise de resultados de trabalhos publicados na literatura e por dados de frequência dos polimorfismos, obtidos do banco de SNPs do National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2013), dos quais foram analisados a importância dos genes nas FLP, como metabolizante de agrotóxicos, e a importância clínica dos mesmos, além da frequência populacional.

4.6) REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Anteriormente a técnica de Snapshot (descrita a seguir), foi necessária realizar a amplificação do DNA alvo do estudo através da técnica de Reação de Cadeia da Polimerase (PCR).

Todo o protocolo utilizado para a amplificação do DNA alvo (volume da reação, concentração de DNA em ng, concentração de primer em picomoles, aditivos da PCR, temperatura de extensão e anelamento), foi otimizado.

O termociclador utilizado para a reação de amplificação foi o Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Foi utilizado o kit Qiagen Multiplex PCR, seguindo instruções do fabricante.

4.7) SNAPSHOT

Neste trabalho, foi realizado o estudo do SNP rs4630 do gene *GSTT1*, porém ele pertence a um projeto maior que inclui o estudo de mais 7 SNPs de outros genes.

A análise dos marcadores genéticos foi realizada pela técnica de SNaPshot Multiplex System, através da genotipagem de 7 SNPs distribuídos em um painel, escolhemos esta técnica pois é um método baseado em extensão de primer desenvolvido para análises de polimorfismos de base única (SNPs) marcado com fluorescência (Figura 6) esta técnica tem a capacidade de ser realizada em multiplex, podendo ser analisados 10 SNPs em uma única reação, independentemente das suas posições no cromossomo ou a distância de separação entre SNPs de locu vizinhos, facilitando na hora da análise dos resultados.

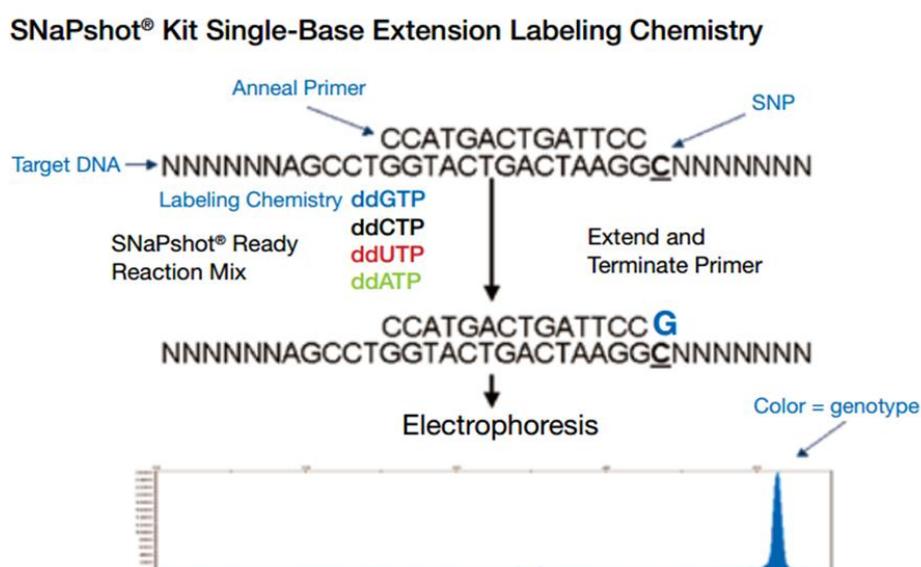


Figura 6: leitura da técnica de SnaPshot a partir da eletroforese capilar, em um sequenciador automático, de um polimorfismo de base única de uma sequência de DNA

Fonte: Invitrogen 2013

Em nossa pesquisa a técnica de SnaPshot Multiplex foi realizada através do SNaPshot® Kit Single-Base Extension Labeling Chemistry seguindo as instruções do fabricante.

O polimorfismo de base única (SNPs) a ser analisado foi o *GSTT1* (rs 4630). Esses SNP após ter seus primers amplificados por PCR, foi submetido à uma limpeza enzimática com a Shrimp alkaline phosphatase (SAP), seguido da reação de SNaPshot propriamente dita.

Neste método os produtos de PCR são utilizados como molde para a adição de um único didesoxirribonucleotídeo marcado com fluoróforo na posição do sítio polimórfico. Para isso um terceiro oligonucleotídeo (Primer SNaPshot), além do par de primers da PCR, é usado para cada marcador. O primer de SNaPshot é desenhado de modo a se anelar no produto de PCR na região anterior ao nucleotídeo polimórfico, de modo que quando a reação ocorrer a DNA polimerase incorporará o nucleotídeo correspondente ao sítio polimórfico.

O produto da reação é desnaturado em formamida (Formamide Hi-Di, Applied Biosystems) e submetido à 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.

4.8) ESTÁTISTICA

A análise estatística foi realizada através dos programas estatísticos SPSS v. 12.0 e BioEstat v. 5.0. Os testes realizados foram testes de Regressão Logística Multipla, teste χ^2 e o teste exato de Fisher. O nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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. As análises realizadas no estudo foram as de alteração da fala e molecular.

5.1 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DE FALA

A partir do levantamento dos dados analisados detectou-se alterações fonaudiológicas de fonemas no paciente portador de fissura labiopalatal, pode-se observar ainda, que independente do tipo de fissura e classificação das mesmas, as alterações de fala sempre estão presentes assim como, os fonemas para produção do som para a projeção da voz, sempre apresentam-se alterados independente da idade. Santos (2000).

Dentre as alterações apresentadas, constam:

- (a) **DISTÚRBIOS ARTICULATÓRIOS COMPENSATÓRIOS:** Encontrados nos portadores de fissuras labiopalatinas, com substituição de fonemas ou em conjunto com a articulação dos mesmos.
- (b) **ALTERAÇÕES RELACIONADAS A FATORES DENTO-OCCLUSAIS:** Distorções oro-laterais caracterizadas pela distorção dos fonemas fricativos como modificação na liberação da pressão e do fluxo aéreo através de constrições na parte anterior da cavidade oral, decorre de uma inadequada oclusão dentária.
- (c) **ALTERAÇÕES RELACIONADAS A INADEQUAÇÃO VELOFARÍNGEA:** O mau funcionamento do mecanismo velofaríngeo é um dos principais responsáveis pela presença das alterações de fala, uma vez que pode haver um desequilíbrio na ressonância oro-nasal, prevelecendo á ressonância nasal, conseqüentemente uma emissão nasal auditivel.

Além dessas alterações de fala, observou-se distúrbios articulatorios simples, que são os mesmos que as crianças sem FLP em idade cronológica em desenvolvimento normal apresentam como as omissões de fonemas, distorções e substituições simples (Altmann1997) .

Outros fatores podem contribuir para as modificações dos padrões de fala como a hipertrofia da cicatriz resultante da cirurgia, tornando a mobilidade labial comprometida. Sobre isso, Carvalho (2002) ressalta a importância das massagens e dos exercícios de mobilidade na região da cicatriz do lábio.

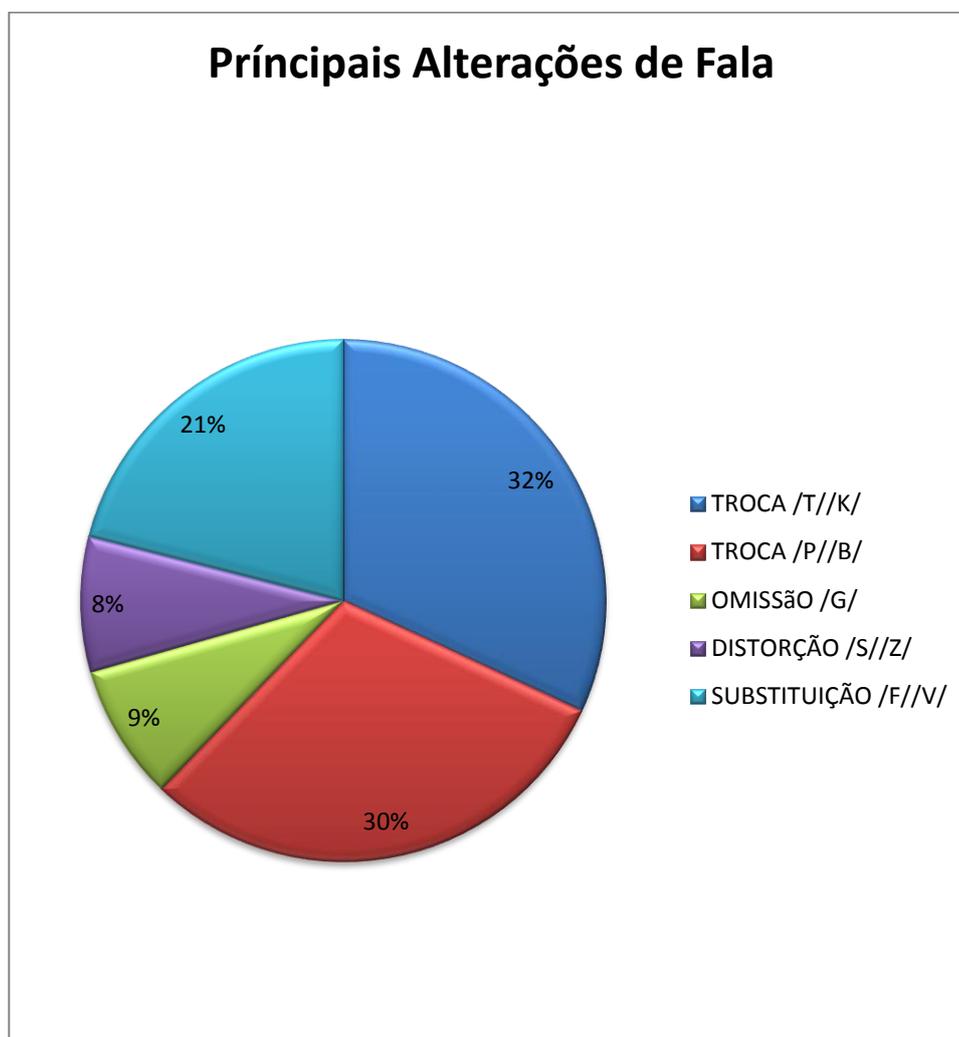


Gráfico 1 – Principais Fonemas Alterados

Fonte- Prontuários analisados/HOL

5.2) ANALISE MOLECULAR.

A distribuição de frequências para os tipos de fissuras entre os acometidos foi de

12% para fissuras somente labiais, 19% para fissuras somente palatais, o restante, 69% das fissuras em nosso grupo amostral, atingiam o lábio e o palato.

Entres as mães envolvidas no estudo, 25% declararam ter contato cotidianamente com agrotóxicos, incluindo-se o período de gravidez do (a) filho (a) com FLP (Gráfico 2).

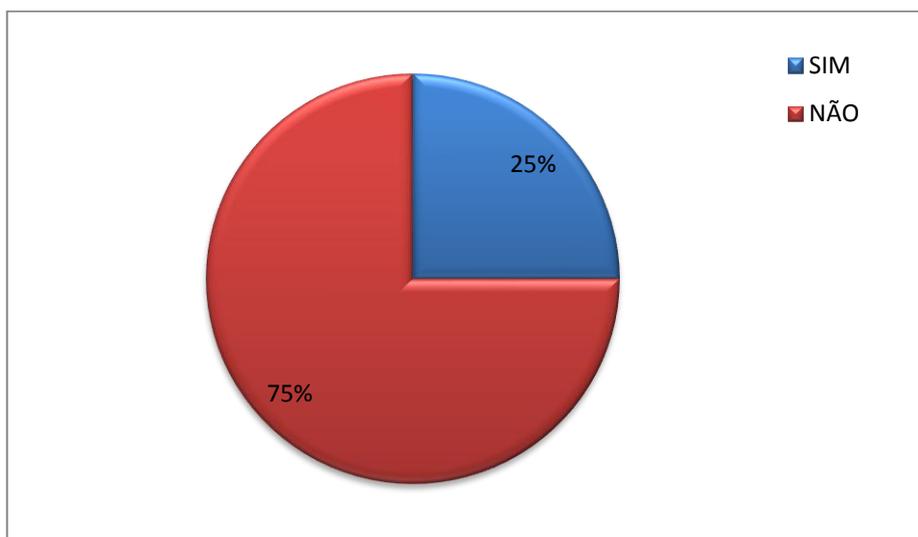


Gráfico 2 – Fonte de dados dos Pacientes do Hospital Ofir Loyola, quanto ao uso de agrotóxico.

Os genótipos de todos os polimorfismos do grupo estudado foram analisados pelo painel gerado pela técnica de SNaqshot (Figura 7), os SNPs estão representados por picos de vários tamanhos e cores diferentes, para serem melhor analisados.

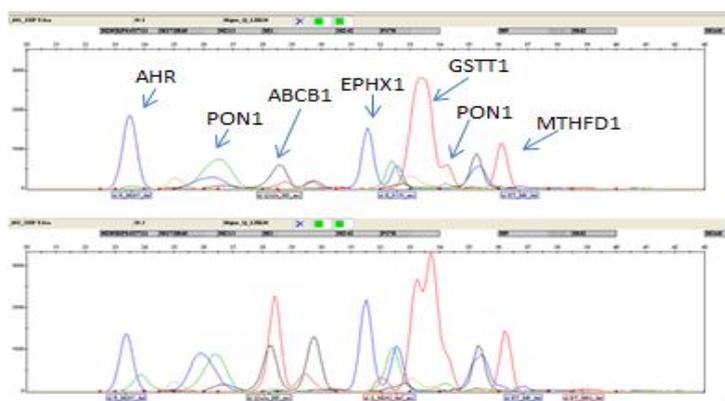


Figura 7- Leitura do painel de duas amostra pela técnica de SNaPshot gerada em nosso trabalho.

A distribuição encontrada em nossas amostras, de frequências genótípicas referentes aos polimorfismos das enzimas envolvidas, entre outras coisas, no metabolismo dos agrotóxicos, assim como as frequências populacionais são provindas do banco de dados SNP500 Cancer, sobre as variações humanas (Tabela 2).

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 as populações asiáticas), estimamos as frequências populacionais de nossa região, de acordo

Genótipos	Acometido Mãe	Global	Caucasiana*	Africana*	Asiática*	Estimada
-----------	---------------	--------	-------------	-----------	-----------	----------

com a ancestralidade descrita acima. Desta forma, as frequências genótípicas esperadas para a nossa população seriam conforme as descritas nas colunas intituladas como “Estimada”.

Nosso resultado consiste de seis análises estatísticas diferentes. E para discussão de nosso estudo conseguimos cruzar dados dos nossos achados, com as poucas literaturas descritas no assunto, analisando os genótipos de maior relevância

	N (%)	N (%)					
C/C	0						16
		2 (2,0)	22 (26,5)	6(7,0)	57 (68,6)	17 (21,0)	(19,2)
C/T	78 (94,0)	77(93,0)	9 (11,0)	9 (11,0)	9 (11,0)	11 (13,0)	9 (11,0)
T/T	5 (6,0)						58
		4 (5,0)	52 (62,5)	68 (82,0)	17 (20,4)	55 (66,0)	(69,8)

.Tabela 2 – Distribuição genotípica do Polimorfismo do GSTT1 (rs4630)

Fonte:SNP 500 câncer

Inicialmente, verificamos 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 à agrotóxicos, e intrauterinamente dos filhos, ao agrotóxico. Pois, já foi relatado, que a exposição das mães à solventes orgânicos tal como xileno, tolueno, acetona e especialmente benzeno, tem aumentado as taxas de risco do filho nascer com fissura oral (Wyszynski e Beaty 1996; Wennborg *et al.*, 2005). Para esta análise, utilizamos o teste exato de fisher, e comparando os acometidos com a população, tivemos um resultado significativo para o genótipo T/T que está menos presente em nosso número amostral do que na população, mostrando que talvez este genótipo proporcione uma maior eficiência em metabolizar pesticidas evitando esse tipo de malformação (P= 0,004).

Entretanto, alterações nesse gene já foram implicadas em alterações no desenvolvimento fetal e na gestação (Nukui *et al.*, 2004; Carmichael *et al.*, 2006). Isto demonstra a influência sobre o destino da formação do indivíduo, principalmente em uma gestação sob influência de diversos xenobióticos. Reforçando a ideia de que precisamos continuar pesquisando o polimorfismo do gene *GSTT1*, que está correlacionado a esta má formação.

Além disso, Hozaz *et al.*, 2005 constatou que o mal funcionamento do gene *GSTT1* devido a presença de um polimorfismo, concomitante a disfunção do gene *GSTM1*, evidenciou um risco relativo de 6,85 ($p < 0,01$) no desenvolvimento de FLP em indivíduos poloneses.

Outro estudo demonstrou que a ausência de *GSTT1* no feto aumentou em 4,2 vezes o risco de desenvolvimento de FLP, quando as mães fumavam de 10-14 cigarros/dia no período gestacional. Tal risco era ainda maior (17,1 vezes) quando a mãe consumia mais de 15 cigarros/dia demonstrando uma forte influência xenobiótica na etiologia das FLP em indivíduos com alterações em *GSTT1* (Shi *et al.*, 2007).

Em um segundo momento, pelo teste qui quadrado, verificamos a frequência alélica dos acometidos e população para verificar se existe um alelo específico que poderia estar influenciando na eficiência metabólica desses genes.

Para este cálculo encontramos que o alelo C está mais presente em nosso número amostral do que na população, mostrando que esta presença no polimorfismo pode dificultar o funcionamento deste gene e aumentar o risco para ter FLP ($P=0,007$).

Alguns estudos comprovaram que o Tabagismo materno aumenta o risco de um bebê nascer com fissuras, em particular quando a mãe carrega as variantes nulas de *GSTT1*

comparadas com as não-fumantes e com o genótipo tipo selvagem. Comprovando que o mal funcionamento deste gene pode causar uma dificuldade maior de metabolizar xenobióticos, aumentando o risco da mãe ter um filho com FLP (Van Rooij IA, *et al.* 2001; Lammer, *et al.* 2005; Shi, *et al.* 2007; Vieira, 2008).

Em uma terceira análise, 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 um quarto estudo, verificamos se os genótipos encontrados nos indivíduos que apresentam FLP estão relacionados à exposição relatada aos agrotóxicos, como fator etiológico destas más formações. Não encontramos resultado estatisticamente significativo para estes dois testes.

Shaw *et al.* 2003, não encontraram associações significativas quando foi avaliada a presença de polimorfismos no gene *GSTT1*, o uso de pesticidas e herbicidas e o risco de desenvolvimento de diversas malformações congênitas, entre elas as FLP.

Porém, alguns estudos relataram que "a interação gene-ambiente" pode desempenhar um papel chave no aumento do risco de câncer de bexiga urinária em indivíduos que são geneticamente mais susceptíveis devido à presença do genótipo nulo de *GSTM1/GSTT1* durante o seu encontro de rotina ou exposição a pesticidas (Sharma, *et al.* 2013; Siddarth, *et al.* 2014). Comprovando que indivíduos que possuem este gene alterado, tem maior dificuldade de metabolizar agrotóxicos, causando uma maior probabilidade de gerar doenças.

Em uma quinta análise, procuramos comparar os genótipos das mães que usaram agrotóxico com as que não usaram e comparamos os filhos que foram influenciados por esse uso com os que não foram influenciados, para verificar se existe algum genótipo que possa influenciar no metabolismo do agrotóxico. Não foi encontrada relação estatisticamente significativa para esta variável.

De acordo com os achados, Godoy, *et al.* 2014 não encontrou-se associação entre o genótipo nulo de *GSTT1* e a intoxicação por pesticidas. Mostrando que o funcionamento ou não deste gene, não influencia no metabolismo de agrotóxicos.

Contudo, Sharma, *et al.* 2012 encontraram que o polimorfismo no gene *GSTT1* pode influenciar na exposição pré natal à pesticidas causando a restrição do crescimento fetal. Comprovando que a disfunção deste gene pode resultar em más formações orais.

Em uma última análise, procuramos verificar pelo teste de regressão logística simples, se a característica genotípica desses alvos de estudo, possa ter influenciado no fenótipo do tipo de fissura, seja somente labial, seja palatal ou labiopalatal. Não foi encontrado nenhum resultado significativo para este tipo de análise.

No entanto, Marazita *et al.* 2009 fez um estudo sobre o genótipos de seus genes candidatos e o fenótipo das fissuras orais, e encontraram que uma região do gene *IRF6* tem uma associação maior com a fissura labial e outra região do gene *FOXE1* estava mais associado com a FLP demonstrando que existe uma relação entre o tipo de fissura e o genótipo afetado.

6) CONCLUSÃO

Em nosso estudo na análise fonoaudiológica, concluímos que os indivíduos acometidos por FLP em nossa amostra apresentam alterações fonoaudiológicas que dificultam na articulação e produção de fala consequentemente apresentando um distúrbio na comunicação oral comprometendo a produção adequada da fala no desenvolvimento da criança.

Para o estudo molecular das mães e pacientes, a distribuição dos genes e tipos de FLP foi semelhante aos dados já relatados anteriormente de indivíduos com FLP de populações diversas. Entre as mães que participaram no estudo houve relatos de exposição ambiental a agrotóxico relacionado ao aumento do risco de FLP.

Para este tipo de estudo constatamos que a presença do alelo C no genótipo dos indivíduos pode influenciar no metabolismo de xenobióticos e aumentar o risco para desenvolver fissuras.

Além disso, encontramos que o genótipo T/T está menos presente em nosso número amostral que na população, mostrando que talvez este genótipo proporcione uma maior eficiência em metabolizar pesticidas evitando esse tipo de malformação.

Um maior número amostral pode ser necessário para substanciar a análise da influência na etiologia das FLP.

REFERÊNCIAS

ABHISHEK S, KAURS N, S, LATA M, SHARMA JK, A. Association of *GSTM1* and *GSTT1* gene deletions with susceptibility to DNA damage in the pesticide-exposed workers of Punjab. **Rejuvenation Res.** 2010.

ABRAMOWICZ, S.; COOPER, M.E.; BARDI, K.; WEYANT, R.J.; MARAZITA, M.L. **J Am Dent Assoc.** 2003 Oct;134(10):1371-6.

ALTMANN, E.B.C. Fissuras labiopalatinas. 3ª ed. São Paulo: Fono; 1994

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informações do setor. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>>. Acessado em 12/03/2014.

AMSTALDEN-MENDES, L.G. XAVIER, A.C. ANTUNES, D.K. FERREIRA, A.C.R.G. TONOCCH, R. FETT-CONTE, A.C. SILVA, R.N. LEIRIÃO, V.H.V. CARAMORI, L.P.C. MAGNA, L.A. GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L. Estudo multicêntrico da época do diagnóstico de fendas orais. *J. Pediatr. (Rio J.)* vol.87 no.3 Porto Alegre May/June 2011.

ANDERSEN HR, WOHLFAHRT-VEJE C, DALGARD C, CHRISTIANSEN L, KATHARINA M, NELLEMAN C, MURATA K, TINA K, NIELS J, SKAKKEBÆK E, GRANDJEAN, P. 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 EAL, DEGA ML, CHÂTEAUT EÉ. DEWAILLY. Relation between methylmercury exposure and plasma paraoxonase activity in inuit adults from Nunavik. *Environmental Health Perspectives.* 2011.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M. **BioEstat 5.0:** Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamiraua; Brasília: CNPq, 2007. 291p.

BARONEZA, J.E.; FARIA, M.J.S.; KUASNE, H.; CARNEIRO, J.L.V.; OLIVEIRA, J.C. dados epidemiológicos de portadores de fissuras labiopalatinas de um instituição especializada de Londrina, estado do Paraná. **Acta Sci. Health sci.** 27, p. 31-35, 2005.

BERNAL-HERNÁNDEZ YY1, MEDINA-DÍAZ IM, BARRÓN-VIVANCO BS,

BIANCHI, F.; CIANCIULLI, D.; PIERINI, A.; SENIORI COSTANTINI, A. congenital malformations and maternal occupation; a registry based case-control study. *Occup Environ Med.*, v. 54, p. 223-8, 1997.

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.

CAPELOZZA FILHO, L.; SILVA FILHO, O.G.; fissuras labiopalatais. In: PETRELLI, E. *Ortodontia para fonoaudiologia*. Curitiba: Lovise, p. 195-239, 1992.

CARINCI F, SCAPOLI L, ANALISA P, ZOLLINO I, PESSETTE F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip And palate: An update. *International journal of othorinolaryngology*. 71, p. 1509-1519. 2007.

CARMICHAEL, S. L. et al. Risk of limb deficiency defects associated with NAT1, NAT2, GSTT1, GSTM1, and NOS3 genetic variants, maternal smoking, and vitamin supplement intake. *Am J Med Genet A.*, v. 140, n. 18, p. 1915-22, Sep. 2006

CARREIRÃO, L. S. *Tratamento das fissuras lábiopalatinas*. 2ª ed. Rio de Janeiro:

CARVALHO, EVELINE. *TRATAMENTO FONOAUDIOLOGICO DA FISSURAS LABIOPALATINAS*. 2002.

CASTILLA, E. et al. **Prevención primaria de los defectos congénitos**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1996. p.71-93.

CHEN, X.K.; WEN, S.W.; FLEMING, N.; YANG, Q.; WALKER, M.C. Teenage pregnancy and congenital anomalies: which system is vulnerable? *Hum Reprod*; 22, p. 1730-35, 2007.

CHEVRIER C1, BAHUAU M, PERRET C, IOVANNISCI DM, NELVA A, HERMAN C, VAZQUEZ MP, FRANCANNET C, ROBERT-GNANSIA E, LAMMER EJ, CORDIER S. Genetic susceptibilities in the association between maternal exposure to tobacco smoke and the risk of nonsyndromic oral cleft. *Am J Med Genet A*. 2008.

CHIQUETE, B.T.; BLANTON S.H, A. et al. Variation in VNT genes is associates with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *HUM.MOL.GENET*, V 17 p. 212-218, 2005

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.

DEROO, L. A.; GAUDINO, J. A.; EDMONDS, L. D. Orofacial Cleft Malformations: Associations With Maternal and Infant Characteristics in Washington State. *Birth Defects Research*. 67, p. 637–642, 2003.

FARIA, N.M.X., FASSA, A.G.,FACCHINI, L.A. Pesticidas poisoning in Brazil: The oficial notification system and challenges to conducting epidemiological studies. *Cien Saude Colet*: 12.p.25-38, 2007

GARCIA EG, ALMEIDA WF. Exposição dos trabalhadores rurais aos agrotóxicos no Brasil. *Rev Bras Saúde Ocup*, v. 19, n. 72, p. 7–11, 1991.

GODOY FR, COSTA EO, DA SILVA REIS AA, BATISTA MP, DE MELO AV, GONÇALVES MW, CRUZ AS, DE ARAÚJO MELO CO, MINASI LB, RIBEIRO CL, DA CRUZ AD, DE MELO E SILVA D. Do GSTT1 and GSTM1 polymorphisms influence intoxication events in individuals occupationally exposed topesticides? *Environ SciPollut Res Int*. 2014.

GORLIN RJ, COHEN MM, LEVIN LS. *Syndromes of the head and neck* (4ed).New York: Oxford University Press. 2001.

HARTRIDGE, T.D.B.S. The Role of Folic Acid in Oral Clefting.*British Journal of Orthodontics*. 26,p. 115–120, 1999.

HARVILLE, E.W.; WILCOX, A.J.; LIE, R.T.; ABYHOLM, F.; VINDENES, H. Epidemiology of cleft palate alone and cleft palate with accompanying defects. *Eur J Epidemiol*. 22, p. 389-395, 2007.

HOLLIER, LM; LEVENO, K.J.; KELLY, M.A.; MCINTIRE, D.D.; CUNNINGHAM, F.G. Maternal age and malformations in singleton births. *Obstet Gynecol*. 96, p. 701-706, 2000.

HONEIN, M.A.; RASMUSSEN, S.A.; REEFHUIS, J. et al. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. **Epidemiology**.18, p. 226-233, 2007.

LAMMER EJ, SHAW GM, IOVANNISCI DM, FINNELL RH. Maternal smoking, genetic variation of glutathione s-transferases, and risk for orofacial clefts. **Epidemiology**. 2005.

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.

LEWIS, J; Andreassen, M; Leeper, H; Macrae, D; Vochalcharacteristics of children with cleft lip/palate and associated velopharyngeal incompetence. *Journal of otolaryngology* 22: 113-117, 1993.

LIE RT, WILCOX AJ, TAYLOR J, GJESSING HK, SAUGSTAD OD, AABYHOLM F, VINDENES H. Maternal smoking and oral clefts: the role of detoxification pathway genes. **Epidemiology**. 2008.

LIMA, P. D. et al. Genotoxic effects of rotenone on cultured lymphocytes. **Genet Mol Res.**, v.4, n. 4, p. 822-31, Dec. 2005.

LITTLE, J.; CARDY, A.; ARSLAN, M.T.; GILMOUR, M.; MOSSEY, P.A. Smoking and orofacial clefts: a United Kingdom-based case-control study. **Cleft Palate Craniofac J**. 41, p. 381–386, 2004.

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.

LOFREDO, J.L. Fissura labiopalatina: Avaliação e diagnóstico Ed 1 Tratamento fonoaudiológico. Rio de Janeiro: Revinter 1992

MARAZITA ML, LIDRAL AC, MURRAY JC, FIELD LL, MAHER BS, GOLDSTEIN MCHENRY T, COOPER ME, GOVIL M, DAACK-HIRSCH S, RILEY B, JUGESSUR A, FELIX T, MORENE L, MANSILLA MA, VIEIRA AR, DOHENY K, PUGH E,

VALENCIA-RAMIREZ C, ARCOS-BURGOS M. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. **Hum Hered.** 2009.

MARAZITA, M.L.; FIELD, L.L. COOPER, ME et al., COOPER, M.E. et al. Nonsyndromic cleft lip. *AMJ Hum Genet* 75, p161-173, 2002

MASOOD N1, YASMIN A, KAYANI MA. Genetic deletions of GSTM1 and GSTT1 in head and neck cancer: review of the literature from 2000 to 2012. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2013.

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.

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

MOORE K. L.; PERSAUD, T. V. N. *Embriologia Clínica*. Elsevier, Rio de Janeiro,

MOSSEY, P.A.; DAVIES, J.A.; LITTLE, J. Prevention of orofacial clefts: does pregnancy planning have a role? **Cleft Palate Craniofac J.** 44,p. 244–50, 2007.

MUNGER, R.G.; ROMITTI, P.A.; DAACK-HIRSCH, S.; BURNS, T.L.; MURRAY, J.C.; HANSON, J.; **Teratology.** 1996 Jul;54(1):27-33.

MURRAY, J.C. Face facts: Genes, environment and clefts *AMJ Hum Genet*, p57:227-232 *AMJ Hum Genet*, 2002

NCBI – National Center for Biotechnology Information. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>ORRIT, E., Talence, I .and Basché, T.(2001) *single Molecule Spectroscopy*, Springer-Verlag, Berlin.

NUKUI, T. *et al.* Maternal/newborn GSTT1 null genotype contributes to risk of preterm, low birthweight infants. **Pharmacogenetics**, v. 14, n. 9, p. 569-76, Sep. 2004.

ORRIT, E., Talence, I .and Basché, T.(2001) single Molecule Spectroscopy, Springer-Verlag, Berlin.

PARLE- MCDERMOTT, A., KIRKE P.N, MILLS, J. L., MOLLOY, A. M., COX. 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.

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.

POLLETA, FA, CASTILLA. EE, ORIOLII 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, MALCOM 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.

PUSCHECK, E.E.; JEYENDRAN, R.S.The impact of male factor on recurrent pregnancy loss.**Curr Opin Obstet Gynecol.** 19, p. 222–228, 2007.

REEFHUIS, J.; HONEIN, M. A.;Maternal Age and Non-Chromosomal Birth Defects, Atlanta—1968–2000: Teenager or Thirty-Something, Who Is at Risk? **Birth Defects Research.**70, p. 572–579, 2004.

REITER R, HAASE S, BROSCHE S.[Orofacial clefts].*Laryngorhinootologie.* 2012.

*Revinter.*1996.

RIBEIRO EM, MOREIRA ASCG. Update about the multidisciplinary treatment of cleft lip and palate. *R.B.P.S.*, v.18(1), p.31-40, 2005.

RIORDAN JR, 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.

ROBLEDO-MARENCO MDE L, GIRÓN-PÉREZ MI, PÉREZ-HERRERA NE, QUINTANILLA-VEGA B, CERDA-FLORES R, ROJAS-GARCÍA AE. Paraoxonase 1 and its relationship with pesticide biomarkers in indigenous Mexican farmworkers. *J Occup Environ Med.* 2014.

ROCAS M, JAKUBAUSKIENE E, KANOPKA A. Polymorphism of the aryl-hydrocarbon receptor gene in intron 10 of human cancers. *Rev. bras. pesqui. méd. biol;* 44(11):1112-1117, 2011.

ROMITTI, P. A.; LIDRAL, A. C.; MUNGER, R. J.; DAACK-HIRSCH, S.; BURNS, T. L. and Murray, J. C., candidates genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population based-case control study of orofacial cleft. ***Teratology***, 59, p. 39-50, 1999.

RUIZ-LAGUNA, J. et al. Tissue, species, and environmental differences in absolute quantities of murine mRNAs coding for alpha, mu, omega, pi, and theta glutathione S-transferases. ***Gene Expr.***, v. 12, n. 3, p. 165-76, 2005.

SARTORELLI, E.M.; MAZZUCATTO, L.F. de Pina-Neto JM. Effect of paternal age on human sperm chromosomes. *Fertil Steril.* 76, p.1119-1123, 2001.

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

SCHMID, T.E.; ESKENAZI, B.; BAUMGARTNER, A.; MARCHETTI, F.; YOUNG, S.; WELDON, R.; ANDERSON, D. et al. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. ***Hum Reprod.*** 22, p. 180–187, 2007.

SHARMA E, MUSTAFA M, PATHAK R, GULERIA K, AHMED RS, VAID NB, BANERJEE BD. A case control study of gene environmental interaction in fetal growth restriction with special reference to organochlorine pesticides. ***Eur J ObstetGynecolReprod Biol.*** 2012

SHARMA T1, JAIN S, VERMA A, SHARMA N, GUPTA S, ARORA VK, DEV BANERJEE B. Gene environment interaction in urinary bladder cancer with special reference to organochlorine pesticide: a case control study. **Cancer Biomark.** 2013;13(4):243-51. doi: 10.3233/CBM-130346.

SHAW, G. M. *et al.* Maternal occupational chemical exposures and biotransformation genotypes as risk factors for selected congenital anomalies. **Am J Epidemiol.**, v. 157, n. 6, p. 475-84, Mar. 2003.

SHAW, G.M.; WARSSEMAN, C. R.; LAMMER, E. J.; O' MALLEY, C. D.; MURRAY, J. C.; BASART, A. M.; AND TOLAROVA, M.M. () Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor- alpha gene variants. **Am. J. Hum. Genet.**58, p. 551-561, 1996.

SHI, M. *et al.*, Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. **Am J Hum Genet.**, v. 80, n. 1, p. 76-90, Jan. 2007. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola. Informações do setor. Disponível em <www.sindag.com.br>. Acessado em 03/02/2013.

SIDDARTH M1, DATTA SK, MUSTAFA M, AHMED RS, BANERJEE BD, KALRA OP, TRIPATHI AK. Increased level of organochlorine pesticides in chronic kidney disease patients of unknown etiology: role of GSTM1/GSTT1 polymorphism. **Chemosphere.** 2014.

SILVA FILHO, O.G.; FERRARI JUNIOR, F.M.; ROCHA, D.L.; SOUZA FREITAS, J.A. Classificação das fissuras lábio palatais: breve histórico, considerações clínicas e sugestão de modificação. **Ver. Bras. Cirur.** 82, p. 59-65, 1992.

SILVA JM, FARIA HP, SILVA EN, PINHEIRO TMM. Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a agrotóxicos. 2006.

SILVA, H.A., BORDON, A.K.C.B., DUARTE, D.A. Estudo da fissura labiopalatina: Aspectos clínicos desta máformação e suas repercussões. **Jornal Brasileiro de Fonoaudiologia** V4, P. 71,74, 2003

SILVEIRA VDAS, CANALLE R , 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 03/02/2014.

SINGH AB, BOUSMAN CA, NG CH, BYRON K, BERK M. *ABCB1* polymorphism predicts escitalopram dose needed for remission in major depression. *Transl Psychiatry*. 2012 Nov 27;2:e198.

SINGH MS, MICHEAL M. Role of Xenobiotic Metabolic Enzymes in Cancer Epidemiology. In: Verma M, editor. *Cancer Epidemiology*. Vol. 2. New York: Humana Press; 2009. pp. 243–264.

SKARE O, JUGESSUR A, LIE RT, WILCOX AJ, MURRAY JC, LUNDE A, et al. Application of a novel hybrid study design to explore gene-environment interactions in orofacial clefts. *Ann Hum Genet*. 2012 May 76(3): 221-36.

SPENGLER G, TAKÁCS D, HORVÁTH A, RIEDL Z, HAJÓS G, AMARAL L, MOLNÁR J. Multidrug Resistance Reversing Activity of Newly Developed Phenothiazines on P-glycoprotein (*ABCB1*)-related Resistance of Mouse T-Lymphoma Cells. ***Anticancer Res***. 2014.

SPINA V. *et al*. Classificação das fissuras lábio-palatinas. Sugestão de Modificação. *Revista Hospital Clínica Faculdade de Medicina, São Paulo*; v. 27, p. 5-6, 1972).

STANIER P.; MOORE G.E. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human Molecular Genetic*, v. 13, p. 73-81, 2004.

STONE C. *Plastic surgery: facts*, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

STRICKLER SM, DANSKY LV, MILLER MA, SENI MH, ANDERMANN E, SPIELBERG SP. Genetic predisposition to phenytoin-induced birth defects. *Lancet*. 1985.

STUPPIA L, CAPOGRECO M, MARZO G, LA ROVERE D, ANTONUCCI I, GATTA V, PALKA G, MORTELLARO C, TETÈ S. Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate. *J Craniofac Surg*. 2011.

THOMAS FJ, MCLEOD HL, WATTERS JW. Pharmacogenomics: the influence of genomic variation on drug response. *Curr Top Med Chem*. 2004.

THOMAS FJ, MCLEOD HL, WATTERS JW. Pharmacogenomics: the influence of genomic variation on drug response. *Curr Top Med Chem*. 2004.

TRINDADE, I E. K TRINDADE JUNIOR, A. S. ; Avaliação funcional da inadequação velofarigea. In: CARREIRÃO, s.; LESSA, S.; ZANINI, S. A. (Ed.). Tratamento das Fissuras labiopalatinas. 2. Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1996. Cap 26, pag. 223-235.

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

VANDERAS, AP.: Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft palate Journal* 24: 216-225, 1987.

VANROOIJ IA, OCKE MC, STRAATMAN H, ZIELHUIS GA, MERKUS HM, STEEGERS-THEUNISSEN RP. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Prev. Med.*, v.39, p. 689-69. 2001.

VIEIRA AR. Unraveling human cleft lip and palate research. **J Dent Res**. 2008.

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.

WILCOX, A.J.; LIE, R.T.; SOLVOLL, K.; TAYLOR, J.; MCCONNAUGHEY, D.R.; ABYHOLM, F. et al., Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. **BMJ**.p 334-464, 2007.

WYSZYNSKI, D.F AND BEATY, T.H. Review of the role potential teratogens in the origin of the human nonsyndromic oral clefts. **Teratology**, 53, p. 309-317, 1996.

WYSZYNSKI, D.F.; SARKOZI, A.; CZEIZEL, A.E. Oral clefts with associated anomalies: methodological issues. **Cleft Palate Craniofac. J**. 43, p. 1-6, 2006.

WYSZYNSKI, D.F.; BEATY, T.H.; MAESTRI, N.E.; Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. **Cleft Palate Craniofac Journal**. 33,p. 406-417, 1996.

YANG, G.; FAN, L.; TAN, J.; et al. Smoking in China: findings of the 1996 National Prevalence Survey. **JAMA**. 282,1247–1253, 1999.

ZHIWEN, L.I.; JIANMENG, LIU.; RONGWEI, YE.; LE ZHANG.; XIAOYING ZHENG., AND AIGUO RENA. Maternal Passive Smoking and Risk of Cleft Lip With or Without Cleft Palate. **Epidemiology**. 21,p. 240-242, 2010.

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 **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.

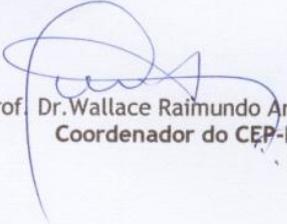
Profº Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

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 nº 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

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres (CEP-ICS/UFPA) - Complexo de Sala de Aula/ CCS - Sala 13 - Cidade Universitária
Professor José da Silveira Netto, nº 01, Guamá - CEP: 66075-110 - Belém-Pará. Tel.: 3201-7735
e-mail: cepccs@ufpa.br/ Site: www.ufpa.br/ics

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____ manifesto meu consentimento com envolvimento do meu filho no projeto de pesquisa intitulado: **Estudo Molecular de Fissuras Labio-palatinas: Investigação de Polimorfismos e Mutações em Genes Candidatos**

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, como foi destacado na folha de informações, 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:

ANEXO C - AVALIAÇÃO FISSURALABIOPALATAL

Data: **Registro:**
Paciente:
D.N: **Idade:**
Mãe: **Profissão:**
Pai: **Profissão:**
Endereço:
Tel: **email:**

Classificação do tipo de fissura:

- Pré-forame**
 Pôs-forame
 Transforame
 Fissuras raras

1. Cirurgias realizadas:

- Queiloplastia**
 Palatoplastia
 Faringoplastia
 Outras _____

2. Observação dos órgãos Fonoarticulatórios.

LABIOS:

- Postura entreaberta**
 Tensão Cicatricial

Estética: **BOA** **RUIM**

Vedação labial **SIM** **NÃO**

Hipotônia **SIM** **NÃO**

ARCADA DENTÁRIA:

- Má oclusão**
 Pré-Maxila projetada
 Uso de aparelho ortodôntico

POSTURA LINGUAL:

- No assoalho** **Projetada**

FREIO LÍNGUAL:

- Normal** **Hipertrófico** **Curto**

PALATO:

Extensão: **Regular** **Curto** **Normal**

Mobilidade: **Boa** **Regular** **Ausente**

Paredes Laterais: **Movimento presente** **Não Visível**

Anel de passavant : **Visível** **Não visível**

Aspecto do Palato: ()Regular ()Irregular ()Fístula

3. HABILIDADE E MOTRICIDADE DOS OFAS:

Lingua: ()Vibra ()Não vibra ()Eleva a ponta ()Lateraliza

Lábios: ()Vibra ()Protui ()Retrai

Sucção:()Com canudo ()Débil

Mastigação: ()Boa ()Ruim

Deglutição:()Presença de refluxo nasal com líquidos.

()Presença de refluxo nasal com sólidos.

Hábitos Bucais: _____

4. AVALIAÇÃO VOCAL:

- Qualidade vocal ()Boa ()Alterada
- Tensão Larigea ()Observável ()Não Observável
- Rouquidão Frequente ()Sim ()Não
- Ressonância ()Sim ()Não

TESTE DO ESPELHO:

(Sopro, Sopro com língua projetada, /i/, /u/, /f/, /s/, /ʃ/, palavras e frases)

TESTE CUL DE SAC

(Emissão de /i/ enquanto ocluí e solta as narinas e depois o mesmo com o /u/)

ANEXO D - FICHA PARA LEVANTAMENTO DE DADOS DO PACIENTE COM FLP.

Nome do paciente: _____

Sexo do paciente: _____

Tipo de fissura: _____

Localidade de nascimento: _____

Nome do pai: _____

Nome da mãe: _____

Data de nascimento do paciente: _____

Idade da mãe: _____

Idade do pai: _____

Uso de cigarro e/ou álcool na gestação: _____

Exposição a radiação durante a gravidez: _____

Grau de consangüinidade: _____

Telefone: _____

Uso de agrotóxicos em lavoura: _____