

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FREQUÊNCIA DE CÂNCER E ANÁLISE GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS
mTOR rs1010447 E *IRE1* rs196929 EM FAMÍLIAS DE PACIENTES COM
FISSURA LABIAL E/OU PALATINA

Ionária Oliveira de Assis

SAPIENTIA AEDIFICAT

2020

IONÁRIA OLIVEIRA DE ASSIS

**FREQUÊNCIA DE CÂNCER E ANÁLISE GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS
mTOR rs1010447 E *IRE1* rs196929 EM FAMÍLIAS DE PACIENTES COM
FISSURA LABIAL E/OU PALATINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Linha de Pesquisa “O cuidado em saúde e a prática odontológica baseados em evidências”.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira

João Pessoa

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A848f Assis, Ionaria Oliveira de.

Frequência de câncer e análise genotípica dos
polimorfismos mTOR rs1010447 e IRE1 rs196929 em
famílias de pacientes com fissura labial e/ou palatina
/ Ionaria Oliveira de Assis. - João Pessoa, 2020.
82 f. : il.

Orientação: Alexandre Rezende Vieira.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Odontologia. 2. Fissura palatina. 3. Fissura labial.
4. Câncer. 5. Epidemiologia. I. Vieira, Alexandre
Rezende. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.314 (043)

Elaborado por Larissa Silva Oliveira de Mesquita - CRB-15/746

IONÁRIA OLIVEIRA DE ASSIS

**FREQUÊNCIA DE CÂNCER E ANÁLISE GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS
mTOR rs1010447 E *IRE1* rs196929 EM FAMÍLIAS DE PACIENTES COM
FISSURA LABIAL E/OU PALATINA**

Banca Examinadora



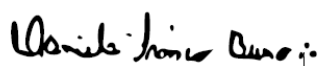
Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira

Orientador - UFPB



Prof. Dra. Sabrina Garcia de Aquino

Examinador - UFPB



Prof. Dra. Daniela Franco Bueno

Examinador – Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês

DEDICATÓRIA

Aos queridos pacientes do setor de Fissuras Labiopalatinas do HULW/UFPB e seus familiares dedico esse trabalho pela solicitude em participar dessa pesquisa e por serem exemplos de garra, determinação e força de vontade. Por ensinarem que mesmo com todas as dificuldades enfrentadas há sempre um motivo para sorrir e seguir em frente.

A minha mãe Joana por ressignificar o câncer.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me iluminar, por me fazer crer nos meus objetivos e não permitir que eu fraqueje em meio aos obstáculos, dou graças!

Ao **Professor Dr. Alexandre Rezende Vieira** pelo apoio, presteza, por estar sempre disponível mesmo à distância. Obrigada por me permitir aprender com o pesquisador que é; agradeço por todos os ensinamentos compartilhados.

A **UFPB** pelo incentivo à qualificação dos seus servidores técnico-administrativos, por nos dar oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

A todos que fazem parte do **PPGO/UFPB**, docentes, discentes e funcionários, pelo empenho em construir uma pós-graduação de qualidade. Em especial, agradeço ao professor Dr. **Ricardo** pela gentileza e por não medir esforços em buscar recursos para o nosso crescimento e para que essa pesquisa se tornasse possível.

A **Rosa Helena** a qual desde o primeiro contato, estendeu-me a mão e acolheu-me ajudando em tudo o que precisei durante essa pesquisa, sobretudo, ensinando a ser uma pessoa e uma profissional melhor. Sua dedicação, não só aos fissurados, mas a tudo o que se dispõe a fazer contagia aqueles que têm o privilégio de conviver com você! Gratidão pelo carinho, pelo exemplo de profissional e ser humano dedicado, paciente, por todo cuidado!

A toda equipe do setor de Fissuras Labiopalatinas do HULW/UFPB meu agradecimento pela acolhida e carinho, pela disponibilidade em ajudar durante cada fase da pesquisa, especialmente a **Danúbia, Greyce, Socorro, Josi, Vitor, Filismina, Cris, Aine, Lindalva, Sayonara, Dr. Paulo, Dr André**.

À família CRAS/UFPB gratidão por colaborarem na realização dessa pesquisa. Não conseguiria executá-la sem o auxílio dos meus queridos pacientes e dos meus colegas de trabalho **Zelândia, Zenaide, Mônica, Julyanna, Mércia, Aninha e Ednaldo**.

A todos do CCAE/UFPB, em especial a **Angeluze** e a **Daniela**, por todo incentivo e compreensão durante as aulas do mestrado e nos momentos que precisei me ausentar.

A todos os meus amigos, às “*freudinhas*” e aos colegas de pesquisa do Vieira Lab João Pessoa, **Julliane, Júnior, Mariana, Alice** pelo suporte, aprendizado e convívio. É extensiva minha gratidão ao Vieira Lab Pittsburgh, em

especial a **Elaine, Kathleen e Mariana** pelo acolhimento e colaboração durante os dias em Pittsburgh. A minha companheira de pesquisa **Bianca** pelo auxílio e ombro amigo nos momentos mais desesperadores, em especial, nos dias corridos durante a execução da pesquisa em Pittsburgh. Gratidão!

Aos meus amados pais, **Jeová e Joana**, pelo incondicional suporte e cuidado em todos os momentos da minha vida. Por acreditarem e torcerem por mim, por estarmos sempre juntos e me amarem tanto! Também agradeço à minha irmã **Izabella** e aos meus príncipes **Davi e Pedro**, sobrinhos amados, que tornam meus dias mais felizes. Amo muito vocês!

À minha família, especialmente às minhas queridas tias **Tânia, Socorro, Ana Lúcia** por estarem tão presente no momento mais difícil da minha vida. Eterna gratidão por tanto carinho e cuidado!

Por fim, minha imensurável gratidão ao meu amor, **Thiago**, por me inspirar e estimular à vida acadêmica. Sua paixão pela docência contagia e me faz querer alçar novos caminhos. Obrigada por vibrar a cada vitória, por ser paciente, suportar os momentos de estresses e enxugar cada lágrima derramada. Mesmo à distância, senti em cada momento seu cuidado e afeto.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Fissuras de lábio e/ou palato constituem o defeito congênito craniofacial mais comum em humanos. A origem dessas fissuras tem sido associada à atuação de fatores genéticos e fatores ambientais e há evidências de que indivíduos nascidos com fissuras orofaciais tem maior prevalência de câncer do que a população em geral. O presente trabalho propôs-se a determinar a frequência de casos de câncer em famílias com fissuras labiais e/ou palatinas comparando-as com um grupo sem fissuras e associá-los aos marcadores dos genes *mTOR* rs1010447 e *IRE1* rs196929 os quais estão associados ao câncer. Oitocentos e trinta e seis indivíduos foram avaliados (303 nascidos com fissura labial e/ou palatina, 256 pais na maior parte, a mãe de indivíduos nascidos com fissura labial e/ou palatina e 277 indivíduos não afetados). Todos os participantes responderam a um questionário com informações demográficas básicas sobre histórico familiar de fissura labiopalatina e câncer. O DNA foi obtido da saliva total e polimorfismos de nucleotídeos únicos *mTOR* rs1010447 e *IRE1* rs196929 foram genotipados usando-se o método TaqMan. Os dados demográficos foram analisados pelo teste qui-quadrado e exato de Fisher considerando significativo valor de $p < 0,05$ e a média de idade entre os grupos foi definida pelo teste *t* de Student. Famílias de pacientes com fissura de lábio e/ou palato apresentaram frequência de câncer menor em relação ao grupo de comparação estudado. Houve um excesso de homozigotos menos comum do *IRE1* rs196929 entre parentes de indivíduos nascidos com fissura labiopalatina quando apresentavam história familiar positiva de câncer em comparação com indivíduos nascidos com fissura labiopalatina ou com indivíduos não afetados não relacionados ($p=0.0006$ e $p=0.00000001$, respectivamente). Esse padrão foi semelhante quando as famílias relataram um tipo de câncer ou múltiplos, ou quando o câncer afetava as mulheres (mama ou trato reprodutivo) ou as estruturas do trato gastrointestinal. Não evidenciamos variações genotípicas significativas no *mTOR* rs1010447 quando comparados aos dados demográficos, a história de câncer e de fumo nos grupos estudados. Os resultados fornecem suporte para um papel da via de estresse do *IRE1*-XPB1 na maior frequência de câncer em famílias de indivíduos nascidos com fissura labiopalatina.

Palavras-chave: fissura palatina, fissura labial, câncer, epidemiologia.

ABSTRACT

Cleft lip and / or palate is the most common craniofacial birth defect in humans. The origin of these clefts has been associated with genetic and environmental factors, such as smoking during pregnancy, use of medications, socioeconomic factors, as well as infectious diseases. There is evidence that individuals born with orofacial clefts have a higher prevalence of cancer than the general population, hence, identifying genetic factors that are related to the risk of cancer and the presence of oral clefts may allow the development of strategies for identification of risk groups. The present study aimed to determine the frequency of cancer in families with individuals born with cleft lip and/or palate and to associate them with mTOR rs1010447 and IRE1 rs196929, which are associated with cancer. Eight hundred and thirty-six individuals were evaluated (303 born with cleft lip and/or palate, 256 parents, mostly the mothers of individuals born with cleft lip and/or palate and 277 unaffected individuals). The parents or guardians of the children answered a questionnaire with basic demographic information about their children and family history of cleft lip and palate and cancer. DNA was obtained from whole saliva and the single nucleotide polymorphisms mTOR rs1010447 and IRE1 rs196929 were genotyped using the TaqMan method. Differences in mean age between the groups were determined by the Student's t test. Relatives of individuals born with cleft lip and palate had a lower frequency of cancer compared to unrelated unaffected individuals. There was an excess of rare homozygotes of IRE1 rs196929 among relatives of individuals born with cleft lip and palate when they had a positive family history of cancer compared to individuals born with cleft lip and palate or with unrelated unaffected individuals ($p=0.0006$ and $p=0.00000001$, respectively). This pattern was similar when families reported one type of cancer or multiple cancers, or when the cancer affected women (breast or reproductive tract) or gastrointestinal tract structures. We did not find evidence for significant genotypic variations in mTOR rs1010447 when comparing it to demographic data, such as the history of cancer and smoking. The results provide support for a role of the IRE1-XPB1 stress pathway in the higher frequency of cancer in families of individuals born with cleft lip and palate.

Keywords: cleft lip, cleft palate, cancer, epidemiology.

LISTA DE TABELAS

Table 1. Demographic characteristics of the studied cohort.	32
Table 2. <i>IRE1</i> rs196929 genotyping data.	34
Tabela 3. Síndromes.....	69
Tabela 4. História de câncer por grupo.	70
Tabela 5. História de câncer por tipo de fissura.	71
Tabela 6. Dados demográficos por tipo de fissura.	72
Tabela 7. Distribuição da frequência de câncer pelos tipos de fissura.	73
Tabela 8. Dados gerais da história de câncer dos grupos e genotipagem do <i>mTOR</i> rs1010447.	74
Tabela 9. Dados gerais dos tipos de fissura e genotipagem do <i>mTOR</i> rs1010447.	75
Tabela 10. Dados gerais dos tipos de fissura e genotipagem do <i>IRE1</i> rs196929.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>AXIN1</i>	<i>AXIS inhibition protein 1 (conductin, axil)</i>
CONT	Controle
<i>CDH1</i>	<i>E-cadherin</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FAM	Familiares
FISS	Fissurados
FL	Fissura Labial
FLP	Fissura Labiopalatina
FP	Fissura Palatina
<i>GSK3B</i>	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i>
<i>IRF6</i>	<i>Interferon Regulatory Factor 6</i>
<i>IRE1</i>	<i>Inositol requiring enzyme 1</i>
<i>MTHFR</i>	<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase</i>
<i>mTOR</i>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RE	Retículo Endoplasmático
<i>SNP</i>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TGI	Trato Gastrointestinal
<i>XBP1</i>	<i>X-Box Binding Protein 1</i>
<i>WNT</i>	<i>Wnt Family Member</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. CAPÍTULO 1	22
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	37
4. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS*	43
ANEXOS	54
ANEXO I	55
ANEXO II	56
ANEXO III	59
ANEXO IV	61
ANEXO V	63
APÊNDICES	68
APÊNDICE I	69
APÊNDICE II	77
APÊNDICE III	79
APÊNDICE IV	82

1. INTRODUÇÃO

As fissuras de lábio e/ou palato estão entre as malformações congênitas de maior prevalência, registrando uma média mundial de aproximadamente 1 em 700 nascimentos vivos, com grande variabilidade de origem geográfica, grupos étnicos, exposições ambientais e nível socioeconômico (1). Em geral, asiáticos e populações nativas americanas têm as maiores taxas de prevalência de nascimentos vivos, que costumam chegar a 1 em 500. Populações de origem europeia têm prevalência intermediária com taxas aproximadas de 1 em 1.000, e os países africanos têm as menores taxas de prevalência com aproximadamente 1 em 2.500 nascidos vivos (2). No Brasil, a prevalência das fissuras é em torno de 1.54 a cada 1.000 nascimentos vivos (3,4). Com uma população excedendo 190 milhões de brasileiros e 3 milhões de nascimentos ao ano, as fissuras de origem não sindrômicas labiais e/ou palatinas são importante problema de saúde pública, com aproximadamente 4.000 (quatro mil) novos casos ao ano (5).

Quanto à embriologia, essas condições orofaciais são resultantes de defeitos primários na fusão dos processos craniofaciais que formam o palato primário e secundário, no primeiro trimestre do desenvolvimento intrauterino (6). Cerca de 70% dos casos de fissuras ocorrem como forma não sindrômica e os 30% restantes, os quais são ditos sindrômicos, são assim definidos por apresentarem anormalidades físicas ou cognitivas adicionais estando associados a distúrbios mendelianos, condições cromossômicas ou teratogênicas (6-9).

Inúmeras classificações foram sugeridas para relacionar os diversos tipos de fissuras de lábio e/ou palato, porém nenhum sistema único é universalmente utilizado. Fogh-Andersen (10) foi pioneiro em utilizar uma abordagem embriológica para classificar as fissuras e o fez a partir do forame incisivo denominando labioleporino as fissuras do Grupo 1 (FL), labioleporino com palato as fissuras do Grupo 2 (FLP) e apenas fissuras de palato àquelas do Grupo 3 (FP) (10). Spina et al (11) propôs, mais tarde, uma classificação semelhante, isto é, baseada no forame incisivo dividindo as fissuras em 4 grupos de acordo com sua localização e o envolvimento ou não de tecido ósseo. Sendo assim, o

Grupo I compreende as fissuras pré-forame incisivo, Grupo II as fissuras transforame incisivo, no Grupo III encontram-se as fissuras pós-forame incisivo e finalmente no Grupo IV são ditas as fissuras raras da face. Assim, as fissuras pré-forame incisivo são ditas direita, esquerda, bilateral ou ainda mediana (quando envolve linha média) e completas ou incompletas (quando apenas em tecido mole). As fissuras transforame são unilaterais ou bilaterais, e as fissuras pós-forame incisivo classificam-se por uni ou bilaterais e completas ou incompletas (11).

A distribuição desses tipos de fissuras na população é variável. As FL e as FLP são mais frequentes no sexo masculino, com proporção variando entre 1,75:1 a 2:1, enquanto as FP são predominantemente mais encontradas na população feminina, atingindo uma frequência de até 1,1:1 em países como o Japão (12-17). Além disso, estudos populacionais reportam uma maior prevalência das FLP do que as FP (13,18).

Cerca de aproximadamente 400 síndromes podem ser acompanhadas por malformações como as fissuras de lábio e/ou palato e aproximadamente 75% das síndromes descritas tem uma causa genética conhecida (19,20). Dentre as mais comumente associadas estão a sequencia de Pierre Robin a qual é uma causa comum de fissura palatina e é definida como uma micrognatia e/ou retrognatia mandibular com glossoptose e fissura palatina; e a síndrome de Van der Woude que corresponde a aproximadamente 2% de todos os casos de fissura e é caracterizada pela presença de fossetas labiais associadas a qualquer combinação de FLP (21). A maioria dos casos de síndrome de Van der Woude é atribuído a mutações em um fator regulador de transcrição de interferon 6 (*IRF6*) (22,23).

A etiologia multifatorial das fissuras que comprometem lábio e/ou palato tem sido alvo de constantes estudos. O que se sabe é que essas desordens têm heterogeneidade genética contribuindo para o defeito vários genes que afetarão o lábio, envolvendo ou não o palato, ou apenas o palato e ainda, a influência de fatores ambientais (2, 24-31).

Fogh-Andersen (10) e Curtis et al. (32) realizaram os primeiros estudos acerca da hereditariedade das fissuras não-sindrômicas. Segundo eles, em

famílias com genitores portadores de fissuras de lábio e/ou palato há um risco de 4% a 10% de concepção de filhos com a mesma condição. E naquelas em que há os pais e um filho a chance aumenta para 17% sobre uma segunda prole. Estudos de herdabilidade demonstram uma contribuição genética estimada em 45 a 85%, dependendo da população (10,32-34). Além disso, tem-se responsabilizado a consanguinidade à etiologia das fissuras orais onde se sugere que a consanguinidade parental possa desempenhar um papel relevante na ocorrência da fissura oral não sindrômica, inclusive na extensão do defeito. Esse achado é comum em países árabes onde a prática de casamentos consanguíneos é frequente (35,36).

Dentre os fatores ambientais mais comumente relacionados sugeridos como envolvidos no aparecimento dessas fissuras destacam-se: idade dos pais, fumo e álcool, fatores socioeconômicos (alimentação inadequada, ausência de pré-natal), distúrbios endocrinológicos, medicamentos como anticonvulsivantes, sedativos, corticosteroides a exemplo da dexametasona e, recentemente, do ondansetron, popularmente conhecido como Vonau, o qual tem sido utilizado nas gestantes para amenizar os sintomas de náuseas e vômitos e que, também, foi associado a um risco aumentado de fissuras orais. (5,16,37-47).

A chance de fissura em crianças cuja mãe fuma é 2 vezes maior em comparação com crianças de mães não fumantes (48). Alguns estudos tem demonstrado uma associação positiva entre fissuras orais e o hábito de fumar materno e também que a exposição ao fumo passivo materno resulta em um aumento de 1,5 vezes no risco de fendas orofaciais não-sindrômicas (39,49). A fumaça do tabaco contém milhares de compostos, alguns dos quais são conhecidos por terem efeitos deletérios durante o desenvolvimento embrionário. Entre os produtos da fumaça, a nicotina é considerada a principal substância teratogênica que altera e atrasa o desenvolvimento do embrião (50,51). Em um estudo realizado nos países nórdicos avaliando-se a associação do uso de rapé e fumo pela mãe antes e durante a gravidez com a presença de malformações orais concluiu-se que ambos estão associados a um maior risco de fissuras orais e malformações no recém-nascido (52).

Indivíduos nascidos com fissuras orofaciais tem uma expectativa de vida mais curta com risco aumentado para todas as principais causas de morte quando comparados a indivíduos nascidos sem fissura (53). Doenças como câncer têm sido sugeridas como um dos fatores que reduzem a expectativa de vida de indivíduos nascidos com fissuras orofaciais (54).

O câncer é uma doença multifatorial, onde fatores genéticos e ambientais desempenham um papel significativo (55). É o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte antes dos 70 anos de idade na maioria dos países. Mutações devido a erros aleatórios durante a replicação normal do DNA desempenham um papel importante na etiologia do câncer, juntamente com o ambiente, o estilo de vida e a hereditariedade (56-58).

A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo, em parte pelo envelhecimento, pelo crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico. A mais recente estimativa mundial, ano 2018, aponta que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer (17 milhões sem contar os casos de câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (9,5 milhões excluindo os cânceres de pele não melanoma). O câncer de pulmão é o mais incidente no mundo (2,1 milhões) seguido pelo câncer de mama (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão) (59). Para o Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (60).

Os planos preventivos para diminuir a incidência de câncer incluem tanto a remoção de agentes ambientais conhecidos por serem cancerígenos quanto à identificação de polimorfismos ou mutações nos genes de suscetibilidade ao câncer. Os indivíduos portadores de genes específicos de suscetibilidade podem ser alvo de programas de triagem mais agressivos e

tratamentos quimiopreventivos, além de serem adequadamente orientados sobre o comportamento no estilo de vida (61).

Evidências epidemiológicas mostraram a associação de câncer e malformações congênitas como as fissuras nasolabiais e FLP em diferentes estudos populacionais (53,61-64). A hipótese é que esses distúrbios podem ocasionalmente ter uma etiologia comum. Estudos genéticos têm apoiado a hipótese de que alguns genes são simultaneamente associados ao câncer e a desordens orofaciais (27,55,65)

Genes da via de sinalização de fatores de crescimento de fibroblastos (*FGF*) têm sido associados com vários tipos de câncer e podem contribuir para aproximadamente 3% dos casos de fissura labial não sindrômica com ou sem fissuras palatinas (64,66). Outros genes que foram associados com câncer e fissura ou outras anomalias craniofaciais tais como *AXIN1*, *CDH1* e *GSK3B* e os da via *WNT*, além do próprio *FGF* têm sido alvos de estudos por despertarem a ideia de que variações nesses genes poderiam contribuir para o desenvolvimento de doenças como fissuras de lábio e palato, surdez congênita, agenesia dentária, microdontia e câncer já que desempenham papel crítico durante o desenvolvimento embrionário (64,67-69).

Há evidências de que indivíduos nascidos com fissuras orofaciais tem maior prevalência de câncer do que a população em geral e os mecanismos sugeridos para explicar essa associação entre câncer e fissura são fatores genéticos compartilhados, isto é, polimorfismos em genes envolvidos na adesão célula-célula e motilidade celular que estariam associados com fissuras e os mesmos genes podem estar envolvidos na carcinogênese (61,64). Este risco é 3 vezes maior em parentes de primeiro e segundo grau e diminui para 1,5 vezes em familiares de terceiro grau (55). Além disso, pais de crianças nascidas com fissura labiopalatina demonstraram ter maior risco de câncer - em particular, linfomas e leucemias (70). Também já foi demonstrado um aumento da frequência de câncer em familiares de fissurados (lábio e/ou palato), fortalecendo a hipótese de que fatores genéticos comuns podem desempenhar um papel no desenvolvimento de ambas as condições (29).

Vários efeitos das fissuras orofaciais podem estender-se até a idade adulta resultando em maior morbidade e mortalidade (64). Isso demonstra que uma melhor compreensão da genética da fissura labial e palatina pode ajudar a melhorar o aconselhamento para as famílias com um possível maior risco de fissuras, e também pode fornecer uma nova visão em pesquisa em câncer e distúrbios psiquiátricos genéticos (41).

Os mecanismos moleculares subjacentes à fissura labial e palatina que coincidem com o câncer incluem as vias do metabolismo do ácido araquidônico, transformando a sinalização beta do fator de crescimento, replicação DNA, ciclo celular e carcinogênese viral (71). Além disso, podem-se incluir sinalizadores intra e extracelulares, que regulam o metabolismo e fisiologia dos mamíferos. Esses genes regulam função de muitos tecidos e quando não funcionam bem, impactam muitas doenças humanas. Dentre eles estão as cascatas do *mTOR* e *IRE1*(informação verbal)¹.

O *mTOR* (alvo mamífero da sinalização da rapamicina) é uma proteína quinase que regula o crescimento, a sobrevivência, o metabolismo e a imunidade das células. Geralmente é montado em vários complexos, como o complexo *mTOR* 1/2 (*mTORC1/2*) e catalisa a fosforilação de vários alvos regulando assim a síntese de proteínas, metabolismo de nutrientes, sinalização de fator de crescimento, crescimento celular e migração. A ativação do *mTOR* promove o crescimento e a metástase de tumores e segundo estudo de meta-análise sobre a relação entre polimorfismos de nucleotídeo único *mTOR* (SNPs) e risco de câncer verificaram que alguns SNPs do *mTOR* estavam correlacionados com risco aumentado de câncer (72,73). Derivados de rapamicina, que são inibidores do *mTORC1*, tornaram-se alvos de estudos por desempenharem papel importante como agentes anticancerígenos eficazes em tipos de tumores específicos, incluindo câncer de mama (74).

O *IRE1* (enzima sequestradora de inositol 1, também conhecida como ERN1) é uma proteína transmembrana residente do retículo endoplasmático (RE) tipo I encontrada nas células do organismo e que também, está presente nos

¹ Comunicação pessoal do Dr. Alexandre Rezende Vieira, em 26 de maio de 2020, recebida por correio eletrônico.

tumores malignos (75). As células cancerosas são geralmente expostas a ambientes estressantes, como hipóxia, privação de nutrientes e outra regulação disfuncional metabólica levando ao estresse do retículo endoplasmático. Como o ramo mais conservado entre as três vias de resposta proteica não dobrada (UPR), a via de sinalização *IRE1*-XBP1 tem sido implicada no desenvolvimento e progressão do câncer. XBP1 ativo atua como um fator de transcrição para regular a expressão de genes alvo ajustante, incluindo muitos fatores oncogênicos. A atividade regulatória de XBP1 na proliferação celular, apoptose, metástase e a resistência às drogas promove a sobrevivência celular, levando à tumorigênese e progressão tumoral (76).

O estresse do RE pode ser ocasionado por condições patológicas tais como infecções virais e mutações que alteram proteínas e tem sido sugerido como causa ou agravante de algumas condições tais como aterosclerose, diabetes, doenças hepáticas, obesidade e câncer (75). Ele é característico das células cancerígenas, mas o papel das vias de sinalização que permitem a resposta ao estresse do RE no desenvolvimento ou supressão do câncer não está bem caracterizado (56,77). Sabe-se que o *IRE1*, em particular, controla a captação mitocondrial de cálcio e ativa a imunidade natural das células (78,79). Essas funções fornecem ao hospedeiro a capacidade de proteger contra infecções e câncer, além disso, o *IRE1* produz o XBP1, um fator de transcrição que é ativado em situações de estresse do RE, estando envolvido nos processos fisiopatológicos de várias doenças inclusive em mecanismos de supressão de células cancerígenas (80,81).

Variantes do gene do estresse do RE bem como do *mTOR* foram estudadas previamente pelo nosso grupo de pesquisa associando-os a várias condições orais e ósseas. A hipótese levantada era que a variação genética nos genes selecionados interrompe a síntese proteica, afetando o metabolismo ósseo e influenciando estados inflamatórios crônicos. O *IRE1* rs196929, em particular, foi associado a condições que incluem respostas inflamatórias intensas por parte do hospedeiro (82).

Para se estudar esses possíveis relacionamentos nós aproveitamos da variação genética na população. A diversidade genética surge devido a mutações

e é importante à adaptabilidade e sobrevivência das espécies. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são o tipo mais comum de variação genética em humanos e ocorrem em média cerca de uma vez em cada 300 pares de bases no nosso DNA, isto é, são diferenças em um único nucleotídeo (83). Um SNP de um determinado gene serve como marcador para aquele gene e um dos métodos utilizados para sua detecção ao longo do DNA é por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a qual é uma técnica de Biologia Molecular que permite replicação “in vitro” do DNA de forma extremamente rápida (84). Com a PCR, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo a detecção rápida dos marcadores genéticos de doenças infecciosas ou doenças genéticas (85).

Os marcadores SNPs tem como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). As mutações mais comuns são as transições, onde ocorrem trocas de uma purina por outra purina (A-G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C-T). Menos frequentes, as transversões ocorrem quando há troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa (C/ T ou A/G). Normalmente, os marcadores SNP são bi-alélicos, ou seja, encontrados apenas dois variantes em uma espécie. Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada. Esses marcadores podem ser utilizados em estudos de associação e mapeamento genético, assim como em ensaios diagnósticos para confirmação de paternidade, identificação individual (rastreabilidade), detecção de doenças genéticas e/ou polimorfismos associados a características de produção (83,86)

Compreendendo que estudos direcionados à associação entre câncer e fissuras de lábio e/ou palato fornecem dados que podem permitir projetos preventivos em portadores dessas condições além de possibilitar um melhor entendimento dos mecanismos inerentes a essas patologias, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar se pacientes com fissura de lábio e/ou palato atendidos no Serviço de Fissuras do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW/UFPB) e seus familiares, na maior parte, a mãe de indivíduos nascidos com fissura labial e/ou palatina, apresentam frequência aumentada de câncer,

comparando-as com indivíduos atendidos no Centro de Referência em Atenção à Saúde (CRAS/UFPB) que não apresentam essas fissuras. Dentre os objetivos específicos, buscamos identificar possíveis fatores ambientais com risco de fissuras orofaciais e câncer bem como, testar se alelos dos marcadores *mTOR* rs1010447 e *IRE1* rs196929, os quais parecem estar envolvidos com o câncer, têm distribuições diferentes, dependendo de haver alguém na família que nasceu com fissura oral.

Os resultados envolvendo o SNP do *mTOR* rs1010447 estão apresentados em tabelas no apêndice.

2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir foi aceito para publicação no periódico “Journal of Craniofacial Surgery”.

***IRE1* Less Common Homozygous Genotype in Families with Positive History of Cancer and Individuals Born with Cleft Lip and Palate**

Ionária O. Assis¹, DDS, Rosa Helena W. Lacerda², DDS, MS, Bianca G.N. Cavalcante¹, DDS, Mariana Bezamat³, DDS, Adriana Modesto⁴, PhD, DMD, Alexandre R. Vieira^{5,*}, DDS, PhD.

¹ Graduate Program of Dentistry, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil,

² Graduate Program of Dentistry, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil and Cleft Lip and palate center, Lauro Wanderley University Hospital, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

³ Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA.

⁴ Department of Pediatric Dentistry, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA.

⁵ Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA and Graduate Program of Dentistry, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, Brasil.

***Corresponding author:** Alexandre R. Vieira, 412 Salk Pavilion, Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, University of Pittsburgh, 335 Sutherland Street, Pittsburgh, PA, 15261, USA, Phone # 412 383-8972; FAX # 412 624-3080; E-mail: arv11@pitt.edu

Funding

This work was supported by in party by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Abstract:

The aim of this study was to test if the marker rs196929 in *IRE1* associated with cleft lip and palate depending on the family history for cancer. A consecutive sample of 836 individuals were recruited between April and October of 2019 (303 born with cleft lip and palate, 256 relatives mostly of the maternal side of individuals born with cleft lip and palate, and 277 unaffected unrelated individuals). Parents or guardians of the children answered a questionnaire with basic demographic information about their children and their family history of cleft lip and palate and cancer. DNA was obtained from whole saliva and *IRE1* rs196929 was genotyped using TaqMan chemistry and end-point analysis. Over-representation of alleles was determined using chi-square as implemented in PLINK using an alpha of 0.05. There was an excess of less common homozygotes of *IRE1* rs196929 among relatives of individuals born with cleft lip and palate when they had positive family history of cancer in comparison with individuals born with cleft lip and palate or with unrelated unaffected individuals ($p=0.0006$ and $p=0.00000001$, respectively). This pattern was similar when families reported one type of cancer or multiple ones, or when cancer affecting females (breast or reproductive tract) or the structures of the gastro-intestinal tract were considered. These results provide support for a role of the ER stress IRE1-XPB1 pathway in the higher frequency of cancer in families of individuals born with cleft lip and palate.

Keywords: cleft lip, cleft palate, cancer, breast cancer, smoking

Introduction

Families of individuals born with cleft lip and palate report more cancer than families not segregating the defect.¹ Molecular mechanisms underlying cleft lip and palate that coincide with cancer include the pathways of arachidonic acid metabolism, transforming growth factor beta signaling, DNA replication, cell cycle, and viral carcinogenesis.² The impairment or excessive activation of endoplasmic reticulum stress (ER stress) has been suggested as a cause or to aggravate cancer,³ and ER stress associates with all pathways cited above.⁴⁻⁸ ER stress also associated with short stature disorders and degenerative cartilage diseases,⁹ which can include cleft palate.¹⁰ We showed that ER stress gene variants are

associated with a number of oral and bone conditions, and *IRE1* rs196929 in particular was associated with conditions that include intense inflammatory responses from the part of the host.¹¹ We hypothesize that this *IRE1* variant may be also associated with families of individuals born with cleft lip and palate, which we showed report cancer more often than families without someone born with cleft lip and palate.¹²⁻¹⁴ Here we tested if *IRE1* (also called *ERN1*) variation was over-represented in relatives of individuals born with cleft lip and palate depending on family history of cancer.

Materials & Methods

After proper Institutional Review Board approval was obtained at the Universidade Federal da Paraíba (approval # 03829018.1.0000.5183) and University of Pittsburgh (approval # 18100093), 836 individuals were evaluated (303 born with cleft lip and palate, 256 relatives of individuals born with cleft lip and palate, and 277 unaffected unrelated individuals). All individuals or their parents or guardians in the case of children answered a questionnaire with basic demographic information about them or their children and their family history of cleft lip and palate and cancer. They also provided a saliva sample for extraction of genomic DNA. Genotyping was performed by the Taqman method¹⁵ with a QuantStudio 6 Flex automatic instrument and pre-designed probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We tested the *IRE1* single nucleotide polymorphism rs196929, which we found associated with inflammatory conditions that lead to bone resorption such as periodontitis and periapical lesions and had good heterozygosity.¹¹ Chi-square and Fisher's exact tests were used to determine Hardy-Weinberg equilibrium and statistically significant differences with an alpha of 0.05. The PLINK software¹⁶ package was used to analyze the distribution of alleles and genotypes between individuals born with clefts, related to the individuals born with clefts and unaffected.

Results

The demographic characteristics of the sample is presented on Table 1. Among the individuals born with clefts, 215 had cleft lip and palate, 52 had cleft lip only, and 36 had cleft palate only. Of the 215 individuals born with cleft lip and

palate, 17 had an associated condition (eight had Van der Woude syndrome, two polydactyly and hand anomalies, two autism, one Down syndrome, one hydrocephaly, one Arnold-Chiari malformation, one hemifacial microsomia, and one encephalocele). Among the 52 cases of cleft lip only, one had Van der Woude syndrome and one had deafness and a palpebral defect. Finally, among the 36 cases of cleft palate only, four had a Pierre Robin sequence. The vast majority of the relatives of individuals born with clefts that participated in this study were mothers of children born with clefts, and therefore the data on family history mostly relates to the maternal side of the family.

Table 2 presents the summary of genotyping data by cancer history. We combined all types of clefts since analyses by individual patterns did not show any different trends. We also did not exclude data on the small number of relatives on the paternal side since this did not dramatically changed the results. We found that relatives of individuals born with cleft lip and palate have an excess of the less common homozygotes of *IRE1* rs196929 that was statistically significant different from both the individuals born with clefts ($p=0.0006$) and the unrelated unaffected individuals ($p=0.00000001$). The children born with clefts had a less pronounced increase of the less common homozygotes of *IRE1* rs196929, but still statistically significant different from the unrelated unaffected individuals ($p=0.03$). This pattern was also obvious when a particular cancer was reported in the family (relatives of individuals born with clefts versus individuals born with clefts, $p=0.008$; relatives of individuals born with clefts versus unrelated unaffected relatives, $p=0.008$; individuals born with clefts versus unrelated unaffected individuals, $p=0.89$) or multiple cancers were reported in the family (relatives of individuals born with clefts versus individuals born with clefts, $p=0.001$; relatives of individuals born with clefts versus unrelated unaffected relatives, $p=0.0001$; individuals born with clefts versus unrelated unaffected individuals, $p=0.13$). Finally, when we combined breast, ovary, uterus, and cervix cancers (relatives of individuals born with clefts versus individuals born with clefts, $p=0.003$; relatives of individuals born with clefts versus unrelated unaffected relatives, $p=0.00002$; individuals born with clefts versus unrelated unaffected individuals, $p=0.11$), or cancer affecting all extension of the gastro-intestinal tract (relatives of individuals born with clefts versus individuals born with clefts, $p=0.2$; relatives of individuals born with clefts versus

unrelated unaffected relatives, $p=0.01$; individuals born with clefts versus unrelated unaffected individuals, $p=0.34$), the pattern remained.

Cigarette smoking (Table 1) is a risk factor for cancer, as well as for cleft lip and palate.¹ The same pattern of over-representation of the less common genotype of *IRE1* rs196929 was seen for paternal and maternal smoking (relatives of individuals born with clefts versus individuals born with clefts, $p=0.0007$ for paternal smoking and $p=0.26$ for maternal smoking, respectively; relatives of individuals born with clefts versus unrelated unaffected relatives, $p=0.00009$ for paternal smoking and $p=0.00005$ for maternal smoking, respectively; individuals born with clefts versus unrelated unaffected individuals, $p=0.41$ for paternal smoking and $p=0.1$ for maternal smoking, respectively). This pattern, did not really change when paternal and maternal smoking were analyzed in the cases with positive family history of cancer (relatives of individuals born with clefts versus individuals born with clefts, $p=0.01$ for paternal smoking and $p=0.25$ for maternal smoking, respectively; relatives of individuals born with clefts versus unrelated unaffected relatives, $p=0.0009$ for paternal smoking and $p=0.13$ for maternal smoking, respectively; individuals born with clefts versus unrelated unaffected individuals, $p=0.7$ for paternal smoking and $p=0.31$ for maternal smoking, respectively).

Discussion

We found an excess of homozygotes of the less common allele of *IRE1* rs196929 among relatives of individuals born with cleft lip and palate. A similar distortion in Hardy-Weinberg equilibrium was previously reported, with an increase in less common homozygote genotypes of a marker in *MTHFR*, among women born with cleft lip and palate who had a child born with cleft lip and palate.¹⁷ This kind of effect cannot be detected by using other approaches such as the transmission disequilibrium test¹⁸ because uninformative homozygous parents are automatically dropped from the analysis.

Cases diagnosed as syndromes or with other known entities were not excluded from this study since they are believed to not affect the likelihood of cancer occurring in families, and were in small numbers and therefore, unlikely to

dramatically impact the results. Hence, the analysis including these cases showed no marked differences (data not shown). Further, there is no reason to believe that not a similar factor may influence the frequency of cancer in the families despite different types of clefts (syndromic and non-syndromic) occurring. Over the years, we have always analyzed definitions of clefts, “cleft lip only”, “cleft lip with cleft palate”, and “cleft palate only” separately and then in combination (cleft lip with or without cleft palate, cleft lip with cleft palate plus cleft palate only, and all cases together).¹⁹⁻²³ Excluding the few cases of cleft palate only from the analyses presented here did not markedly changed the results (data nor shown) and there was no reason to believe factors predisposing to cancer in these families were not the same. The results reported here, combining all families, allow for the maximum statistical power.

All individuals included in the study are primarily from the city of João Pessoa, which is comprised, according to the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, www.ibge.gov.br), by approximately 85% of Whites or Whites mixed with individuals of African or Amerindian descent. Frequency of alleles do not suggest that population substructure influenced our findings since the group that shows difference is related to the group of individuals born with clefts, and it was expected that these two groups would resemble each other even more than they resemble the group of unrelated unaffected individuals.

Being concerned about multiple testing, we avoided applying the strict Bonferroni correction and increasing type II error. If we had used Bonferroni correction, we would have lowered the alpha to 0.002 (0.05/10 comparisons as listed in Table 2 for three groups). At the level, some of the p-values described in the results would not be formally statistically significant, although the trend of the data is clear. We have demonstrated before²⁴ that known true associations are missed when correction for multiple testing is implemented. This is likely the case here in which we have shown that families of children born with cleft lip and palate report more often cancer.¹²⁻¹⁴

One limitation of our study is that the information regarding more distant relatives can be imprecise. Our experience shows that information is reliable mostly to first-degree relatives.²⁵ More distant these relatives are, less reliable is

the information or knowledge about individual health status of others in the family. However, there is no reason to believe that any of the three study groups (individuals born with clefts, relatives of individuals born with clefts, and unrelated unaffected individuals) would have more knowledge about cancer in their family. Our previous study has suggested adult individuals who survived cancer report family history of oral clefts more often than controls without cancer experience.²⁵ This is the first time we suggest an underlying mechanism for these associations. Our findings indicate that the ER stress IRE1-XBP1 pathway is a possible explanation for the reason why cancer is reported more often in families that had a child born with cleft lip and palate.

Acknowledgments

The authors are indebted to the participants of the study and the Smile Train for the support of the treatment of cleft lip and palate individuals.

Ethical approval. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/ or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent. Informed consent was obtained from all individual participants included in this study.

Declaration of Competing Interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

Authors Contributions. A.R.V. conceptualized and designed the study and analyzed, interpreted data, and wrote the first draft of the manuscript. Material preparation and clinical data collection were performed by I.O.A., B.G.N.C., and R.H.W.L., genotyping data generation, and data analysis were performed by I.O.A., B.G.N.C., R.H.W.L., and M.B., A.R.V., R.H.W.L., and A.M. helped further with the design and resources. All authors commented on previous versions of the manuscript, read and approved the final manuscript.

References

1. Vieira AR. Genetic basis of craniofacial deformities and malocclusion, oral clefts, and craniosynostosis. In: Vieira AR. *Genetic basis of oral health conditions*. Cham: Springer, 2020:59-72.
2. Wang H, Qui T, Shi J, et al. (2016). Gene expression profiling analysis contributes to understanding the association between non-syndromic cleft lip and palate, and cancer. *Mol Med Rep* 2016;13(3):2110-2116.
3. Di Conza G, Ho PC. ER stress responses: An emerging modulator for innate immunity. *Cells* 2010;9(3): E695.
4. Rong X, Albert CJ, Hong C, et al. LXRs regulate ER stress and inflammation through dynamic modulation of membrane phospholipid composition. *Cell Metab* 2013;18(5):685-697.
5. Han C, Jin L, Mei Y, Wu M. Endoplasmic reticulum stress inhibits cell cycle progression via induction of p27 in melanoma cells. *Cell Signal* 2013;25(1):144-149.
6. Dicks N, Gutierrez K, Michalak M, et al. Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer. *Front Oncol* 2015;5:11.
7. Asha K, Sharma-Walia N. Virus and tumor microenvironment induced ER stress and unfolded protein response: from complexity to therapeutics. *Oncotarget* 2018;9(61):31920-31936.
8. Liu Z, Li C, Kang N, et al. Transforming growth factor β (TGF β) crosstalk with the unfolded protein response is critical for hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2019;294(9):3137-3151.
9. Rellman Y, Dreier R. Different forms of ER stress in chondrocytes result in short stature disorders and degenerative cartilage diseases: New insights by cartilage-specific ERp57 knockout mice. *Oxidative Medicine and Cell Longevity* 2018;2018:8421394.

10. Gawron K. Endoplasmic reticulum stress in chondrodysplasias caused by mutations in collagen types II and X. *Cell Stress and Chaperones* 2016;21(6):943-958.
11. Bezamat M, Deeley K, Khaliq S, et al. Are mTOR and endoplasmic reticulum stress pathway genes associated with oral and bone diseases? *Caries Res* 2019;53(3):235-241.
12. Menezes R, Marazita ML, Goldstein McHenry T, et al. AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. *J Am Dent Assoc* 2009;140(1):80-84.
13. Vieira AR, Khaliq S, Lace B. Risk of cancer in relatives of children born with isolated cleft lip and palate. *Am J Med Genet A* 2012;158(6):1503-1504.
14. Yildirim M, Seymen F, Deeley K, et al. Defining predictors of cleft lip and palate risk. *J Dent Res* 2012;91(6):556-561.
15. Ranade K, Chang MS, Ting CT, et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 2001;11(7):1262-1268.
16. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Hum Genet* 2007;81(3):559-575.
17. Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S. Maternal *MTHFR* genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 2002;39(5):368-369.
18. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993;52(3):506-516.
19. Vieira AR, Karras JC, Orioli IM, et al. Genetic origins in a South American clefting population. *Clin Genet* 2002;62(6):458-463.
20. Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, et al. *MSX1* and *TGFB3* contribute to clefting in South America. *J Dent Res* 2003;82(4):289-292.

21. Warrington A, Vieira AR, Christensen K, et al. Genetic evidence for the role of *loic* at 19q13 in cleft lip and palate. *J Med Genet* 2006;43(6):e26.
22. Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America. *Am J Med Genet A* 143(17):2075-2078.
23. Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, et al. Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only. *Braz J Med Biol Res* 2008;41(8):689-693.
24. Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, et al. Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts. *Genet Med* 2008;19(9):668-674.
25. Taioli E, Ragin C, Robertson L, et al. (2010) Cleft lip and palate in family members of cancer survivors. *Cancer Invest* 2010;28(9):958-962.

Table 1. Demographic characteristics of the studied cohort.

		Individuals Born with Clefts		Relatives of Individuals born with Clefts		Unaffected Unrelated Individuals	
N		303		256		277	
Sex	Females	135		224		170	
	Males	168		32		107	
Mean age (years)		13.76		37.17		27.82	
Family history of clefts	Yes	No		Yes	No	Yes	No
	151	148		78	178	0	277
Mean paternal age at birth (in years)		29.7		31.17		30.75	
Mean maternal age at birth (in years)		25.82		26.66		26.89	
Paternal smoking	Yes	No		Yes	No	Yes	No
	74	216		137	106	74	199
Maternal smoking	Yes	No		Yes	No	Yes	No
	36	265		95	160	42	235
Family history of							
Any cancer		258		171		266	
Breast		49		33		58	
Prostate		23		18		29	
Cervix/Uterus		29		22		13	
Lung		18		8		22	
Stomach		18		10		16	

Leukemia	17	11	18
Skin and melanoma	7	7	22
Intestine	9	6	17
Throat	15	11	4
Brain	9	4	10
Liver	9	6	6
Oral cancer	6	6	8
Bone	11	7	2
Thyroid	6	3	6
Esophagus	4	3	1
Pancreas	0	1	7
Colorectal	0	2	2
Ovary	2	1	1
Kidney	0	0	3
Gold bladder	0	0	3
Bladder	0	0	3
Eyes	1	0	1
Pharynx	0	0	1
Bile duct	0	0	1
Spleen	1	0	0
Did not know	24	12	13

Table 2. *IRE1* rs196929 genotyping data.

	Individuals born with clefts	Relatives of individuals born with clefts	Unrelated unaffected individuals
All sample			
CC	99	70	82
CT	81	29	80
TT	25	32	8
Individuals with positive family history of any cancer			
CC	60	38	50
CT	52	11	54
TT	10	16	7
Individuals with positive family history of a single cancer			
CC	39	26	37
CT	39	11	33
TT	8	12	3
Individuals with positive family history of multiple types of cancer			
CC	21	12	13
CT	13	0	21
TT	2	4	1

Individuals with positive family history of women's cancer (breast/ovary/uterus/cervix)			
CC	26	16	16
CT	24	2	23
TT	4	8	3
Individuals with positive family history of gastro-intestinal tract cancer (oral/throat/stomach/liver/intestine/colorectal/pancreas/esophagus/gall bladder/pharynx/bile duct)			
CC	22	15	15
CT	14	4	18
TT	4	5	2
Paternal smoking			
Individuals with history of paternal smoking			
CC	23	46	23
CT	20	13	25
TT	5	17	2

Individuals with history of paternal smoking and family history of cancer			
CC	14	25	15
CT	12	4	17
TT	3	8	2
Parental smoking history Individuals with positive history of maternal smoking			
CC	12	25	10
CT	11	13	15
TT	2	9	2
Individuals with history of maternal smoking and family history of cancer			
CC	9	10	5
CT	7	7	11
TT	1	6	2

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Existe evidência de uma relação entre fissuras de lábio e/ou palato e câncer, no entanto ainda permanece obscuro o papel exato que fatores comuns, ambientais e genéticos, exerçam na etiologia dessas condições (87).

O presente estudo avaliou a frequência de câncer em pacientes com fissura de lábio e/ou palato e seus familiares, comparando-os com pacientes não portadores dessa condição e sem histórico de fissura, testando dois SNPs de genes envolvidos em processos de câncer, o *mTOR* rs1010447 e o *IRE1* rs196929.

Embora tenhamos incluído na amostra dos fissurados pacientes portadores de síndromes, como Van der Woude e Pierre Robin, as quais apresentam um traço de herança geneticamente mediado e parecem ter uma maior tendência a câncer, nossos achados não diferiram quando comparados pacientes não sindrômicos fissurados e com síndrome porque eram poucos casos (Tabelas 3, 4) (88).

Resultados do nosso estudo não demonstraram maior frequência de câncer entre os fissurados e o grupo não afetado, nem entre os familiares dos fissurados e o grupo não afetado. Na verdade, o relato de história de câncer foi maior no grupo de comparação estudado, indo contra a maioria dos achados já descritos na literatura, que indicaram história de câncer mais frequente em famílias de pacientes com fissura (26,55,61,70,89). Importante ressaltar que comparando o número de relatos de câncer entre fissurados e seus familiares, houve um maior número de casos nos fissurados, o que provavelmente é atribuído à história do outro lado da família não entrevistado. Alguns autores corroboram os nossos achados por não encontrarem aumento da frequência de câncer em pacientes com fissura e seus familiares (62,87) (Tabela 4).

Outros pontos a serem considerados, uma vez que fatores ambientais podem estar associados à frequência de câncer e fissuras, são a idade dos pais ao nascimento e o hábito de fumar dos pais (5,37,38,48,51). Quando comparamos a idade da mãe e do pai ao nascimento observamos que, embora a

média de idade entre os grupos tenha tido diferenças significativas estatisticamente, a diferença nominal era de aproximadamente um ano. Também verificou-se diferença significativa entre o fumo do pai e a presença de variação de *IRE1* rs196929 entre os grupos de fissurados e parentes ($p= 0.0007$) e familiares e indivíduos não afetados ($p= 9.0E-5$). Essa diferença foi encontrada também para a história de fumo da mãe e variação em *IRE1* rs196929 entre os grupos de familiares e indivíduos não afetados ($p=0.00005$) (Tabela 2). No entanto, não foram observadas diferenças quando avaliadas por tipo de fissura (Tabelas 9,10).

A contribuição do estresse do RE para o desenvolvimento de transtornos relacionados ao tabagismo tem sido cada vez mais apreciada. A fumaça do cigarro contém uma mistura complexa de mais de 7000 componentes potencialmente perigosos incluindo oxidantes, aldeídos, hidrocarbonetos aromáticos. Essas moléculas podem danificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Neste contexto, respostas adaptativas funcionais são críticas para proteger as células de compostos tóxicos do fumo. A evidência acumulada indica que os extratos de fumaça induzem o estresse do RE e as mortes celulares em células epiteliais do pulmão, células inflamatórias e outras (90-92).

O *mTOR* é associado a problemas importantes na cavidade oral, como cárie, doenças periodontais e ósseas e, também está relacionado ao câncer (71,74,79). No entanto, escaneamento do genoma não demonstrou ligação ou associação de *IRE1* ou *mTOR* com fissuras orofaciais (93-95) e, no nosso estudo, não demonstramos variações no *mTOR* nos grupos estudados (Tabelas 8,9).

A limitação mais frequente encontrada em estudos que avaliaram a associação entre fissura labial e palatina com câncer é a informação sobre câncer ser autorreportada. Mesmo com essa limitação nossos achados demonstraram maior relato de herança de câncer feminino (mama, colo do útero e ovário) e do trato gastrointestinal entre os pacientes fissurados. Também conseguimos verificar essa frequência entre os tipos de fissuras FL, FLP e FP (Tabelas 2, 5-7, 10).

Dados de um estudo realizado em Pittsburgh, EUA, também mostraram que famílias com indivíduos nascidos com FLP relatam câncer de mama e color-

retal com mais frequência do que famílias sem bebês nascidos com defeitos congênitos, incluindo fendas orais (64). Já Dietz et al. (87) analisaram o risco de câncer de mama em famílias com FLP, mas eles não conseguiram confirmar um aumento geral no risco de câncer de mama entre mulheres de famílias com fendas.

Avaliando-se a frequência de fissuras em pacientes portadores de leucemia, Martelli et al. (62) não observaram aumento na frequência de fissuras orais em pacientes portadores de leucemias. Zhu et al. (70) relataram um risco aumentado de linfoma e leucemia que também foi demonstrado por Dias et al (96) recentemente, verificando que a frequência de fendas orais não sindrômicas aumentou no primeiro grau de familiares de pacientes com leucemia linfoblástica aguda. No entanto, Gonçalves et al. (97), avaliando o risco de leucemia em familiares de primeiro grau de pacientes com fissura labiopalatina, não observaram aumento na frequência de leucemia.

Taioli et al. (61) identificaram maior risco de fissura oral em sobreviventes de câncer com uma possível associação preferencial para câncer testicular, melanoma e cólon-retal. Cardoso et al. (98) não encontraram aumento de fissuras em pacientes portadores de câncer gástrico, diferentemente de um estudo de caso controle realizado no Paquistão no qual ter histórico de câncer na família foi associado, independentemente, a 5,19 vezes maior chance de a criança nascer com FLP (89).

Um dado deste trabalho que chama a atenção é a história de fissura relatada entre os pacientes e parentes de fissurados. Aproximadamente 50% dos pacientes portadores de algum tipo de fissura apresentava outro parente com o mesmo defeito (Tabela 1). Esse dado nos fez verificar se a história provinha mais do lado paterno ou materno. Dentre os pacientes com fissura, encontramos que 61 casos tinham história materna e 52 dos fissurados tinham história de fissura da família do pai. Dado semelhante foi encontrado no trabalho de Fogh Andersen (10) onde ele estudou herança de fissuras de lábio e palato em 498 pacientes e verificou que a maioria daqueles que obteve dados da origem da fissura, a mesma segregava mais pelo lado materno. Além disso, também coletamos dados de consanguinidade dos pais dos fissurados e observamos que aproximadamente

22 (7,3%) apresentavam algum grau de parentesco, diferentemente de estudos realizados em algumas regiões do mundo, como na Palestina onde o casamento consanguíneo é comum, e o histórico familiar positivo de fenda maior (cerca de 60% de fissuras em casamentos consanguíneos) (99).

A faixa etária foi diversificada entre os grupos estudados. Indivíduos não afetados eram mais jovens do que os demais grupos e é válido ressaltar que 52 dos 303 portadores de fissura de lábio e/ou palato eram menores de quatro anos. Talvez essa idade jovem seja um fator relevante quando do relato de câncer, já que a chance de ter câncer aumenta com a idade e os parentes dessas crianças ainda são relativamente jovens (Tabela 1, 6).

Quanto ao sexo nossos dados são similares à frequência mundial que aponta maior número de casos do sexo masculino (N=168) (14,15) e, entre os tipos de fissuras estudados, o mais encontrado na população analisada foi a FLP (N=215). Vale ressaltar ainda que, embora tenhamos avaliado os resultados dos pacientes com fissura considerando o tipo de fissura acometido por eles, os valores encontrados não demonstraram diferença significativa (Tabela 1,6).

Não conseguimos coletar a idade de início do câncer, o que torna impossível determinar se familiares ou indivíduos nascidos com fissura desenvolvem câncer em idades anteriores à do grupo não afetado, o que corresponde um fator limitante desse trabalho.

Embora não tenhamos achado um aumento da frequência de câncer em famílias de pacientes com fissuras de lábio e/ou palato, é importante destacar o papel que os SNPs estudados desempenham no organismo. Sabe-se que o *IRE1* está envolvido com várias doenças de armazenamento, incluindo uma série de processos neurodegenerativas e câncer. Além disso, sua contribuição mecanicista em doenças esqueléticas genéticas associadas com anormalidades das placas de crescimento e nanismo é considerada (100). Tem-se ainda, tentado demonstrar o papel da via IRE1-XBP1 como opção terapêutica para alguns tipos de câncer tais como carcinoma de células escamosas oral e mama (76,101).

Por sua vez, o *mTOR* é fundamental na regulação de vários processos celulares que são críticos para a tumorigênese (a ativação do *mTOR* promove o

crescimento de tumores e metástase já que participa na regulação de crescimento celular, proliferação e sobrevivência além de ser um mediador chave para a síntese e crescimento de proteínas) e de vias de sinalização envolvidas em múltiplas patologias incluindo diabetes, câncer, processos degenerativos, bem como em alterações causadas por osteopenia, osteoporose e problemas periodontais (82,101-103).

Outrossim, vale salientar que o presente estudo buscou associar um SNP específico do *mTOR* (rs1010447) o qual não demonstrou ligação/associação com fissuras e/ou câncer, no entanto, por saber-se que o *mTOR* tem sido relacionado com câncer na literatura, inclusive sendo propostos mecanismos de inibir a ação desse gene (inibidores de *mTOR*) para assim viabilizarem o tratamento dessa patologia, é importante verificar uma possível relação dos mesmos com fissuras (72,73,104,105). Nossos achados são pioneiros já que não existem dados avaliando esses dois SNPs específicos com câncer e fissura.

Assim sendo, correlacionar câncer e FLP com polimorfismos pode nos auxiliar a compreender melhor os mecanismos que envolvem esses processos permitindo num futuro próximo propor medidas de aconselhamento genético eficazes na redução dessas patologias.

4. CONCLUSÕES

Famílias de pacientes com fissura de lábio e/ou palato apresentaram menor frequência de câncer em relação à população em geral. O polimorfismo no *mTOR* rs1010447 não se mostrou associado com a frequência de câncer nos pacientes avaliados, e a via de estresse *IRE1-XBP1* é uma possível explicação para razão pela qual o câncer é relatado com maior frequência em famílias que tiveram um filho nascido com fissura labiopalatina.

REFERÊNCIAS*

1. Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013;163C(4):246-258.
2. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011;12(3):167–78.
3. Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MAF. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res*. 2009;23(1):38-42.
4. Martelli Junior H, Porto LV, Martelli DRB, Bonan PRF, Freitas AB, Coletta RD. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. *Braz Oral Res* 2007;21(4):314-7.
5. Martelli DRB, Cruz KW, Barros LM, Silveira MF, Swerts MSO, Martelli Junior H. Maternal and paternal age, birth order and interpregnancy interval evaluation for cleft lip-palate. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(1):107-12.
6. Meng L, Bian Z, Torensma R, Von den Hoff JW. Biological Mechanisms in Palatogenesis and Cleft Palate. *J Dent Res*. 2009 Jan;88(1):22-33.
7. Matulevičienė A, Preikšaitienė E, Linkevičienė L, Radavičius AM, Utkus A, Kučinskis V. Heterogeneity of Oral Clefts in Relation to Associated Congenital Anomalies. *Medicina (Kaunas)*. 2013;49(2):61-6.
8. Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Show WC. Cleft lip and palate. *The Lancet* 2009;374(9703):1773-1785.
9. Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Associated malformations in patients with oral clefts. *Am J Med Genet A*. 2007 October;143(20):2463-2465.
10. Fogh-Andersen P. Inheritance of harelip and cleft palate. Copenhagen: Munksgaard 1942.
11. Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classificação das fissuras lábio-palatinas. Sugestão de modificação. *Rev. Hosp Clin Fac Med São*

Paulo 1972;27:5-6.

12. Koga H, Iida K, Maeda T, Takahashi M, Fukushima N, Goshi T. Epidemiologic Research on Malformations Associated with Cleft Lip and Cleft Palate in Japan. *PLoS One*. 2016;11(2).
13. Matthews JLK, Oddone-Paolucci E, Harrop RA. The Epidemiology of Cleft Lip and Palate in Canada, 1998 to 2007. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2015 Jul;52(4):417-424.
14. Lei RL, Chen HS, Huang BY, Chen YC, Chen PKT, Lee HY, et al. Population-Based Study of Birth Prevalence and Factors Associated with Cleft Lip and/or Palate in Taiwan 2002–2009. *Plos One*. 2013 March;8(3).
15. Andrade NM, Fernandes TV, Catão ES, Silva GCB, Fernandes LHF, Cavalcanti AFC, et al. Prevalence of cleft lip and palate in Brazilian children 2011 – 2015. *Internet Journal of Medical Update*. 2018 Jan;13(1):10-14.
16. Watkins SE, Meyer RE, Strauss RP, Aylsworth AS. Classification, Epidemiology, and Genetics of Orofacial Clefts. *Clin Plastic Surg*. 2014;41:149–163.
17. Mossey, PA and Catilla EE. Global Registry and Database on Craniofacial Anomalies: Report of a WHO Registry Meeting on Craniofacial Anomalies. 2003, Geneva: World Health Organization.
18. Diwana VK, Gupta G, Chauhan R, Mahajan K, Mahajan A, Gupta R, et al. Clinical and Epidemiological Profile of Patients with Cleft Lip and Palate Anomaly: 10-Year Experience from a Tertiary Care Center in the Sub-Himalayan State of Himachal Pradesh in Northern India. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 2019 Jan-Jun;10(1):82-87.
19. de Bérail A, Lauwers F, Noirrit Esclassan E, Woisard Bassols V, Gardini B, Galinier P. Epidemiology of malformations associated with cleft lip and palate: A retrospective study of 324 cases. *Archives de Pédiatrie*. 2015 Aug;22(8):816-821.
20. Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of Orofacial Cleft Birth Defects. *Curr Genet Med Rep*. 2015;3:118–126.

21. Tijare M, Khan SS, Desai A, Jain M. Syndrome Associated with Cleft Palate and Cleft Lip. *Indian J Dent Adv.* 2012;4(3):920-925.
22. Peyrard-Janyid M, Leslie EJ, Kousa YA, Smith TL, Dunnwald M, Magnusson M, et al. Dominant Mutations in GRHL3 Cause Van der Woude Syndrome and Disrupt Oral Periderm Development. *The American Journal of Human Genetics.* 2014 January;94:23–32.
23. Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet.* 2002;32:285–289.
24. Zhao H, Zhang M, Zhong W, Zhang J, Huang W, Zhang Y, et al. A novel IRF6 mutation causing non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in a pedigree. *Mutagenesis.* 2018;33(3):195–202.
25. Yan C, Deng-qi H, Li-ya C, Mang Y, Ke-hu Y. Transforming Growth Factor Alpha Taq I Polymorphisms and Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate Risk: A Meta-Analysis. *Cleft Palate–Craniofacial Journal.* 2018 July;55(6):814-820.
26. Sabóia TM, Reis MF, Martins AMC, Romanos HF, Tannure PN, Granjeiro JM. DLX1 and MMP3 contribute to oral clefts with and without positive family history of cancer. *Archives of Oral Biology.* 2015;60:223-228.
27. Kückler EC, Sabóia TM, Vieira TC, Lips A, Tannure PN, Deeley K, et al. Studies of genes involved in craniofacial development and tumorigenesis: FGF3 contributes to isolated oral clefts and may interact with PAX9. *Acta Odontologica Scandinavica.* 2014;72:1070–1078.
28. Letra A, Fakhouri W, Fonseca RF, Menezes R, Kempa I, Prasad JL, et al. Interaction between IRF6 and TGFA Genes Contribute to the Risk of Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *PloS One.* 2012;7.
29. Vieira AR. Genetic and environmental factors in human cleft lip and palate. *Front Oral Biol.* 2012;16:19–31.
30. Leslie EJ, Liu H, Carlson JC, Shaffer JR, Feingold E, Wehby G et al. A

Genome-wide Association Study of Nonsyndromic Cleft Palate Identifies an Etiologic Missense Variant in GRHL3. *The American Journal of Human Genetics*. 2016 April;98:744–754.

31. Lidral AC, Moreno LM, Bullard SA. Genetic Factors and Orofacial Cleft. *Semin Orthod*. 2008;14(2):103–114.
32. Curtis EJ, Fraser FC, Warburton D. Congenital Cleft Lip and Palate. *American Journal of Diseases of Children*. 1961;102(6):853-857.
33. Brito LA, Cruz LA, Rocha KM, Barbara LK, Silva CBF, Bueno DF, et al. Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. *Am J Med Genet Part A*. 2011;155:1581–1587.
34. Groesen D, Bille C, Petersen I, Skythe A, Hjelmborg, JB, Pedersen JK, et al. Risk of oral clefts in twins. *Epidemiology*. 2011;22(3):313-319.
35. Silva CM, Pereira MCM, Queiroz TB, Neves LT. Can parental consanguinity be a risk factor for the occurrence of nonsyndromic oral cleft? *Early Human Development*. 2019;135:23–26.
36. Sabbagh HJ, Innes NP, Sallout BI, Alamoudi NM, Hamdan MA, Alhamlan N et al. Birth prevalence of non-syndromic orofacial clefts in Saudi Arabia and the effects of parental consanguinity. *Saudi Med J*. 2015;36 (9):1076-1083.
37. Berg E, Lie RT, Sivertsen A, Haaland ØA. Parental age and the risk of isolated cleft lip: a registry-based study. *Annals of Epidemiology*. 2015;25:942-947.
38. Hermann NV, Darvann TA, Munch A, Kreiborg S. Parental age in relation to the severity of cleft lip and/or palate. *Orthod Craniofac Res*. 2018;21:236–241.
39. Kummet CM, Moreno LM, Wilcox AJ, Romitti PA, DeRoo LA, Munger RG, et al. Passive Smoke Exposure as a Risk Factor for Oral Clefts—A Large International Population-Based Study. *Am J Epidemiol*. 2016;183(9):834–841.

40. Li Z, Liu J, Ye R, Zhang L, Zheng X, Ren A. Maternal passive smoking and risk of cleft lip with or without cleft palate. *Epidemiology*. 2010;21(2):240–2.
41. Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res*. 2008. 87: 119-125.
42. DeRoo LA, Wilcox AJ, Lie RT, Romitti PA, Pedersen DA, Munger RG, et al. Maternal alcohol binge-drinking in the first trimester and the risk of orofacial clefts in offspring: a large population-based pooling study. *Eur J Epidemiol*. 2016;31:1021–1034.
43. Reddy SG, Reddy RR, Bronkhorst EM, Prasad R, Ettema AM, Sailer HF et al. Incidence of cleft Lip and palate in the state of Andhra Pradesh, South India. *Indian Journal of Plastic Surgery* 2010 July-December;43(2):184-189.
44. Lan S-J, Yang X-G, Chen Z, Yang T-Y, Xiang C-H, Zhang D, et al. Role of GATA-6 and Bone Morphogenetic Protein-2 in Dexamethasone-Induced Cleft Palate Formation in Institute of Cancer Research Mice. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2016 September;27(6):1600-1605.
45. Xiao W, Liu X, Liu Y, Zhang D, Xue I. The relationship between maternal corticosteroid use and orofacial clefts – a meta-analysis. *Reproductive Toxicology*. Elsevier. 2017;69:99-105.
46. Huybrechts KF, Hernández-Díaz S, Straub L, Gray KJ, Zhu Y, Paterno E, et al. Association of Maternal First-Trimester Ondansetron Use With Cardiac Malformations and Oral Clefts in Offspring. *JAMA* 2018;320(23):2429-2437.
47. Zambelli-Weiner A, Via C, Yuen M, Weiner DJ, Kirby RS. First Trimester Ondansetron Exposure and Risk of Structural Birth Defects. *Reproductive Toxicology*. 2019 January;83:14-20.
48. Martelli DRB, Coletta RD, Oliveira EA, Swerts MSO, Rodrigues LAM, Oliveira MC, et al. Association between maternal smoking, gender and cleft lip and palate. *Braz J Otorrinolaryngol*. 2015;81(5):514-519.
49. Little J, Cardy A, Munger RG. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organization* 2004;82(3):213-218.

50. Hoyt AT, Canfield MA, Romitti PA, Botto LD, Anderka MT, Krikov S V, et al. Associations between maternal periconceptional exposure to secondhand tobacco smoke and major birth defects. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;215(5):613.e1-613.e11.
51. Sabbagh HJ, Hassan MHA, Innes NPT, Elkodary HM, Little J, Mossey PA. Passive Smoking in the Etiology of Non-Syndromic Orofacial Clefts: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos One* 2015 March;11.
52. Gumneberck A, Bonamy AKE, Wikström AK, Granath F, Wickström R, Cnattingius S. Maternal Snuff Use and Smoking and the Risk of Oral Cleft Malformations - A Population-Based Cohort Study. *Plos One* 2014;9(1).
53. Christensen K, Juel K, Herskind AM, Murray JC. Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. *BMJ* 2004;1-4.
54. Jindal A, Vieira AR. Family history of cleft lip and palate in subjects diagnosed with leukemia. *Am J Med Genet Part A* 2012;158:678-679.
55. Vieira AR, Khaliq S, Lace B. Risk of cancer in relatives of children born with isolated cleft lip and palate. *Am J Med Genet Part A* 2012;158:1503-1504.
56. Song M, Vogelstein B, Giovannucci EL, Willett WC, Tomasetti C. Cancer prevention: Molecular and epidemiologic consensus. *Science* 2018 September 28;361(6409):1317–1318.
57. Tomasetti C, Li L, Vogelstein B, Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 2017;355:1330–1334.
58. Tomasetti C, Vogelstein B, Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 2015;347:78–81.
59. Bray, F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018 Nov;68(6):394-424.
60. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no

Brasil. Vol. 1, Inca. 2019. 25 p.

61. Taioli E, Ragin C, Robertson I, Thurman NE, Vieira AR. Cleft lip and palate in family members of cancer survivors. *Cancer Invest* 2010;28(9):958-962.
62. Martelli DRB, Vieira AR, Fonseca AT, Coletta RD, Soares PBM, Martelli-Junior H. Risk of nonsyndromic cleft lip and palate in relatives of women with breast cancer. *Am J Med Genet Part A* 2014;164:270-271.
63. Yildirim M, Seymen F, Deeley K, Cooper ME, Vieira AR. Defining predictors of cleft lip and palate risk. *J Dent Res* 2012;91:556-561.
64. Menezes R, Marazita ML, McHenry TG, Cooper ME, Bardi K, Brandon C, et al. AXIN2, Orofacial Clefts and Positive Family History for Cancer. *J Am Dent Assoc* 2009 January;140(1):80–84.
65. Williams MA, Biguetti C, Romero-Bustillos M, Maheshwari K, Dinckan N, Cavalla F, et al. Colorectal Cancer-Associated Genes Are Associated with Tooth Agenesis and May Have a Role in Tooth Development. *Scientific Reports* 2018;8(1).
66. Riley MB, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, et al. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *PNAS* 2007 March;104(11):4512-4517.
67. Hozyazs KK, Mostowska A, Wo'jcicki P, Lasota A, Offert B, Balcerek A, et al. Nucleotide variants of the cancer predisposing gene CDH1 and the risk of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Familial Cancer* 2014;13:415–421.
68. Machado RA, Freitas EM, Aquino SN, Martelli DRB, Swerts MSO, Reis SRA, et al. Clinical relevance of breast and gastric cancer-associated polymorphisms as potential susceptibility markers for oral clefts in the Brazilian population. *BMC Medical Genetics* 2017;18:39.
69. Andrade Filho PA, Letra A, Cramer A, Prasad JL, Garlet GP, Vieira AR, et al. Insights from Studies with Oral Cleft Genes Suggest Associations between WNT-pathway Genes and Risk of Oral Cancer. *J Dent Res*

2011;90(6):740-746.

70. Zhu JL, Basso O, Hasle H, Winther JF, Olsen JH, Olsen J. Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? A nationwide study in Denmark. *Br J Cancer* 2002;87:524-528.
71. Wang H, Qui T, Shi J, Liang J, Wang Y, Quan L, et al. Gene expression profiling analysis contributes to understanding the association between non-syndromic cleft lip and palate, and cancer. *Mol Med Rep* 2016;13(3):2110-2116.
72. Hua H, Kong Q, Zhang H, Wang J, Luo T, Jiang Y. Targeting *mTOR* for cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology* 2019;12(71).
73. Zining J, Lu X, Caiyun H, Yuan Y. Genetic polymorphisms of *mTOR* and cancer risk: a systematic review and updated meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 March;7(35):57464-80.
74. Fouqué A, Delalande O, Jean M, Castellano R, Josselin E, Malleter M, et al. A Novel Covalent *mTOR* Inhibitor, DHM25, Shows in Vivo Antitumor Activity against Triple-Negative Breast Cancer Cells. *J. Med. Chem.* 2015;58:6559–6573.
75. Di Conza G, Ho PC. ER stress responses: An emerging modulator for innate immunity. *Cells* 2020;12:E695.
76. Shi W, Chen Z, Li L, Liu H, Zhang R, Cheng Q, et al. Unravel the molecular mechanism of XBP1 in regulating the biology of cancer cells. *Journal of Cancer*. 2019;10(9):2035-2046.
77. Cubillos-Ruiz J, Bettigole SE, Glimcher LH. Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell*. 2017 February;168:692-706.
78. Carreras-Sureda A, Jaña F, Urra H, Durand S, Mortenson DE, Sagredo A, et al. Non-canonical function of IRE1 α determines mitochondria-associated endoplasmic reticulum composition to control calcium transfer and bioenergetics. *Nat Cell Biol* 2019;21:755-767.

79. Dong H, Adams NM, Xu Y, Cao J, Allan DSJ, Carlyle JR, Chen X, Sun JC, Glimcher LH. The *IRE1* endoplasmic reticulum stress sensor activates natural killer cell immunity in part by regulating c-Myc. *Nat Immunol.* 2019;20:865-878.
80. Chen Y, Brandizi F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol.* 2013 November;23(11).
81. Wu R, Zhang QH, Lu YJ, Ren K, Yi GH. Involvement of the IRE1a-XBP1 Pathway and XBP1s-Dependent Transcriptional Reprogramming in Metabolic Diseases. *DNA and Cell Biology* 2015;34(1).
82. Bezamat M, Deeley K, Khaliq S, Letra A, Scariot R, Silva RM, et al. Are mTOR and endoplasmic reticulum stress pathway genes associated with oral and bone diseases? *Caries Res* 2019;53:235-241.
83. Shaw G. Polymorphism and single nucleotide polymorphisms (SNPs). *BJU Int*; 2013;112(5):664–5.
84. Matsuda K. PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement. *Advances in Clinical Chemistry.* 2017 Jan;80:45-72.
85. Chatterjee S, Damle SG. Applicability of PCR Technique in Dentistry and Research. *International Journal of Current Research.* 2016 September; 8(09):38167-38171.
86. Caetano AR. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *R. Bras. Zootec.* 2009;38:64-71.
87. Dietz A, Pedersen DA, Jacobsen R, Wehby GL, Murray JC, Christensen K. Risk of breast cancer in families with cleft lip and palate. *Ann Epidemiology* 2012;22(1):37-42.
88. Setó-Salvia N, Stanier P. Genetics of cleft lip and/or cleft palate: Association with other common anomalies. *Eur J Med Genet.* 2014; 57(8):381-393.
89. Bui AH, Ayub A, Ahmed MK, Taioli E, Taub PJ. Association Between Cleft

- Lip and/or Cleft Palate and Family History of Cancer A Case-Control Study. *Annals of Plastic Surgery* 2018 April;80(4):178-181.
90. Huang C, Wang JJ, Ma JH, Jin C, Yu Q, Zhang SX. Activation of the UPR protects against cigarette smoke-induced RPE apoptosis through up-regulation of Nrf2. *J Biol Chem* 2015;290:5367–5380.
 91. Jorgensen E, Stinson A, Shan L, Yang J, Gietl D, Albino AP. Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in normal and malignant human lung cells. *BMC Cancer* 2008;8:229.
 92. Zhang L, Wang Y, Pandupuspitasari NS, Wu G, Xiang X, Gong Q, et al. Endoplasmic reticulum stress, a new wrestler, in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Transl Res* 2017;9:722–735.
 93. Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, Arcos-Burgos M, Cooper ME, Goldstein T, et al. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet.* 2004 Aug;75(2):161-73.
 94. Radhakrishna U, Ratnamala U, Gaines M, Beiraghi S, Hutchings D, Golla J, et al. Genomewide scan for nonsyndromic cleft lip and palate in multigenerational Indian families reveals significant evidence of linkage at 13q33.1-34. *Am J Hum Genet.* 2006 Sep;79(3):580-5.
 95. Wang Y, Li X, Zhu WL, Guo JZ, Song XM, Li SQ, et al. Genome-wide and interaction linkage scan for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in two multiplex families in Shenyang, China. *Biomed Environ Sci.* 2010 Oct;23(5):363-70.
 96. Dias VO, Martelli DRB, Santos ML, Maia CMF, Andrade RS, Coletta RD, et al. Nonsyndromic Oral Cleft in First-Degree Relatives of Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Dent J (Basel).* 2020 Mar 4;8(1).
 97. Gonçalves E, Martelli DRB, Coletta RD, Vieira AR, Caldeira AP, Martelli Junior H. Risk of leukemia in first degree relatives of patients with nonsyndromic cleft lip and palate. *Braz Oral Res* 2014;28(1):1-3.
 98. Cardoso EF, Martelli DRB, Machado RA, Colleta RD, Souza JD, Barbosa

- FT, et al. Nonsyndromic cleft lip and palate, gastric cancer and tooth agenesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2018 Jan; 1;23(1):e44-8.
99. Saeed OB, Moore MG, Zawahrah H, Tayem M, Kavoosi T, van Aalst JA. The Influence of Consanguinity on Familial Clefting Among Palestinians. *Cleft Palate-Craniofacial J.* 2019;56(8):1072-1079.
100. Gawron K. Endoplasmic reticulum stress in chondrodysplasias caused by mutations in collagen types II and X. *Cell Stress and Chaperones* 2016;21:943–958.
101. Chen H, Yang H, Pan L, Wang W, Liu X, Ren X, et al. The molecular mechanisms of XBP-1 gene silencing on IRE1a-TRAF2-ASK1-JNK pathways in oral squamous cell carcinoma under endoplasmic reticulum stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016;77:108–113.
102. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, et al. An ATP competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* 2009;284:8023–8032.
103. Meng D, Frank AR, Jewell JL. *mTOR* signaling in stem and progenitor cells. *Development* 2018;145.
104. Guo Q, Yu C, Zhang C, Li Y, Wang T, Huang Z, et al. Highly Selective, Potent, and Oral mTOR Inhibitor for Treatment of Cancer as Autophagy Inducer. *J. Med. Chem.* 2018;61:881–904.
105. Paquette M, El-Houjeiri L and Pause A. mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. *Cancers* 2018;10(18).
106. Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 2001;11(7):1262-1268.
-

*De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors -Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

ANEXOS

PUBLICAÇÃO DE ARTIGO NO “JOURNAL OF CRANIOFACIAL SURGERY”

ANEXO II

METODOLOGIA

- **Considerações éticas:**

Respeitando as diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas com seres humanos, de acordo com a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, o presente estudo foi submetido à avaliação do comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley – HULW, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (parecer nº 03829018.1.0000.5183) e da Universidade de Pittsburgh (USA) (parecer nº 18100093) onde foram aprovados para realização da pesquisa.

Os pais ou responsáveis pelos voluntários menores de 18 anos que se dispuseram a participar da referida pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), bem como todos os participantes. Além disso, foram submetidos a um Termo de Assentimento os maiores de 06 anos e menores de 18 anos.

- **Universo amostral, caracterização e tamanho da amostra:**

O universo foi composto por todos pacientes e familiares de portadores de fissuras labiopalatinas tratados no Serviço de Fissuras Labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley – UFPB, João Pessoa-PB; bem como de pacientes atendidos no Setor de Odontologia do Centro de Referência de Atenção à Saúde (CRAS), Campus I, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sendo esses últimos alocados no grupo de comparação da pesquisa.

A amostra foi composta por um total de 836 pacientes, sendo 303 fissurados tratados ou em acompanhamento pós-tratamento no Serviço de Fissuras do Hospital Universitário Lauro Wanderley – UFPB, João Pessoa – PB; 256 familiares de cada paciente fissurado, sendo a grande maioria, as mães desses pacientes; e, para constituir o grupo de comparação de pessoas nascidas sem fissura oral, participaram da pesquisa 277 pacientes atendidos no CRAS/UFPB.

Cálculos de poder estatístico sugeriram que esse tamanho amostral teria poder suficiente para detectar diferenças de frequência entre os dois grupos.

- **Crítérios de elegibilidade**

- Os indivíduos incluídos na amostra foram aqueles que concordaram fazer parte da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).
- Foram excluídos aqueles que não responderem completamente à entrevista ou se recusaram a ter a saliva coletada.

- **Coleta dos dados**

Os dados da pesquisa foram coletados por meio de uma entrevista realizada pela pesquisadora utilizando como instrumento norteador, um questionário formulado com perguntas referentes às condições estudadas (história de câncer, casos de fissura na família), bem como fatores demográficos como sexo, idade. Pacientes e familiares tratados ou em acompanhamento pós-tratamento no Serviço de Fissuras do Hospital Universitário Lauro Wanderley – UFPB, João Pessoa-PB foram convidados a participar. Todos receberam uma explicação a respeito da pesquisa e a partir do aceite, foi realizada a coleta das informações.

A coleta das informações do grupo não afetado por fenda oral, constituído por pacientes atendidos pelo Centro de Referência de Atenção à Saúde (CRAS), Campus I, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), foi realizada de forma semelhante, ou seja, aqueles pacientes que desejaram participar da pesquisa, após prévia explanação da mesma e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram entrevistados pela pesquisadora, respondendo a questionamentos idênticos ao grupo anterior.

Além disso, realizou-se a coleta de saliva de todo grupo estudado a fim de genotipar polimorfismos dos genes *IRE1* (rs196929) e *mTOR* (rs1010447), para testar associação com o defeito. Para cada pessoa, pediu-se que excretasse 4 mL de saliva, coletando-a em um frasco coletor com tampa, que foram congelados e mantidos em refrigeração a -20 graus para posterior extração e

quantificação do DNA. A genotipagem foi realizada pelo método Taqman (99) com um instrumento automático QuantStudio 6 Flex e sondas pré-projetadas (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). No caso dos bebês e daquelas crianças que ainda não conseguiam excretar a saliva, foi colocada esponja na cavidade oral afim de que a mesma absorvesse a saliva e, assim, a mesma fosse despendida em frasco coletor até que se atingisse os 4 ml de saliva necessários.

- **Análise estatística dos dados:**

A diferença na frequência de alelos e genótipos foi realizada utilizando o pacote estatístico PLINK e os dados demográficos foram analisados pelo teste qui-quadrado e exato de Fisher considerando significativo valor de $p < 0,05$.

ANEXO III

RESPOSTA DAS SOLICITAÇÕES DA BANCA DE QUALIFICAÇÃO

- **Comentários/Sugestões Prof.^a Dra. Karina Gottardello Zecchin**

1. Página 19 orientação verbal do orientador (é informal: de repente colocar como dados não publicados): Entendemos que a comunicação verbal já é comum inclusive em artigos e por se tratar de assunto relevante, resolvemos mantê-la.
2. Página 20 “In vitro” colocar entre aspas: foi realizada a correção.
3. Na introdução justificar a escolha dos genes: foi feita justificativa.
4. No artigo só ter mencionado IRE1 e não falar do mTOR: decidimos por explorar os resultados do mTOR na dissertação.
5. Revisar formatação de referências: foi realizada e estão de acordo com a norma da pós-graduação a qual instrui que as referências deverão ser baseadas no formato desenvolvido para referências da área biomédica pelo International Committee of Medical Journal Editors (2006). Este grupo estabeleceu diretrizes em que foram incluídos os formatos de referências desenvolvidos pela National Library of Medicine.
6. Explicar com mais detalhes o grupo controle: foi realizada adequação na introdução.
7. Tabela de câncer, colocar em ordem de frequência decrescente para os tipos de câncer: foi realizada alteração.
8. Curiosidade, separar não só pelo local do sítio primário do tumor mas por grupos (ex: carcinomas x adenocarcinomas x hematopoiéticos x sarcomas, etc): Esse tipo de análise não foi possível uma vez que os dados do trabalho não a permitem.
9. Correlação entre fumo e IRE 1: foi realizada na discussão.
10. Conclusão, revisar quanto ao mTOR: a conclusão foi reescrita.
11. Referência 53, substituir “corn” por “born”: referência corrigida.

- **Comentários/Sugestões Prof.^o Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan**

1. Modificar o título alinhando com o objetivo principal e conclusão: alteração do título realizada.

2. Resumo longo, explicar as siglas: realizaram-se modificações no resumo.
3. Por que esses genes foram escolhidos como alvo e não outros relacionados à carcinogênese? Foi melhor detalhado o porquê de estudar esses genes específicos na introdução.
4. Refrasear incluindo que foi uma avaliação dos ascendentes de pacientes fissurados: no resumo já contemplava a informação de se tratar de ascendentes, especialmente, das mães dos pacientes fissurados.
5. Refrasear o objetivo do artigo: alteração realizada.
6. Tabela de câncer, distinção entre primários e metastáticos: dados do trabalho não nos permitiram realizar essa alteração.
7. Incluir os dados estatísticos na tabela 2 do artigo: o artigo já havia sido submetido.
8. Refrasear a conclusão: foi realizada alteração na conclusão.

Comentários/Sugestões Prof.º Dr. Ricardo Dias de Castro

1. Na metodologia realizar detalhamento do grau de parentesco entre fissurados e familiares: foi realizada correção.
2. Tabelas com informações sobre “gênero” melhorar a formatação: foram realizadas as alterações.
3. Em relação ao fumo, quais as outras substâncias contidas que poderiam estar envolvidas: foi melhor explicado nas considerações gerais.
4. Objetivo específico remover a palavra “risco” substituindo por chance: foi realizada alteração.
5. Indicar no final da introdução onde os dados do mTOR estarão apresentados: foi realizada alteração.
6. Melhorar o título da tabela 2: artigo já havia sido submetido.
7. Melhorar a discussão do artigo: foi realizado ajuste na discussão do artigo.

ANEXO IV
ANUÊNCIAS DOS LOCAIS DO ESTUDO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY
Campus I, s/nº Cidade Universitária 58051-900 João Pessoa – PB

CARTA DE ANUÊNCIA SERVIÇO DE FISSURADOS HULW

Declaro que, autorizo os pesquisadores Ionária Oliveira de Assis, Alexandre Rezende Vieira, Ricardo Dias de Castro pertencentes ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (PPGO/UFPB) e Rosa Helena Wanderley Lacerda pertencente ao SERVIÇO DE FISSURADOS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY/UFPB desenvolvam a pesquisa intitulada CANCER EM FAMÍLIAS DE PACIENTES COM FISSURA LABIAL E/OU PALATINA sob a orientação do professor DR ALEXANDRE REZENDE VIEIRA vinculado ao Programa Pós-Graduação de Odontologia da Universidade Federal da Paraíba (PPGO/UFPB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPB).

Ciente dos objetivos, métodos e técnicas que serão utilizados nessa pesquisa, concordo em fornecer todos os subsídios para seu desenvolvimento, desde que seja assegurado o cumprimento das determinações éticas contidas nas resoluções brasileiras, a exemplo da Resolução CNS nº 466/2012; a garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes, durante e depois do desenvolvimento da pesquisa, sempre que se fizer necessário; de que não haverá nenhuma despesa para esta instituição decorrente da participação nessa pesquisa; E, no caso do não cumprimento dos itens acima, a liberdade de retirar esta anuência a qualquer momento da pesquisa sem penalização alguma para instituição.

O referido projeto será realizado no Serviço de Fissuras Lábiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB, bem como no Centro de Referência e Atenção à Saúde – CRAS/UFPB, e só poderá ocorrer somente a partir da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HULW.

João Pessoa, 23 de novembro de 2018

Paulo Germano Cavalcanti Furtado

Paulo Germano Cavalcanti Furtado

Chefe do Serviço de Fissurados HULW/UFPB



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE REFERÊNCIA DE ATENÇÃO À SAÚDE - CRAS

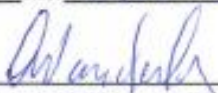
CARTA DE ANUÊNCIA INSTITUCIONAL

Declaro que autorizo os pesquisadores Ionária Oliveira de Assis, Alexandre Rezende Vieira, Ricardo Dias de Castro pertencentes ao PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (PPGO/UFPB) e Rosa Helena Wanderley Lacerda pertencente ao SERVIÇO DE FISSURADOS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY/UFPB desenvolvam a pesquisa intitulada CÂNCER EM FAMÍLIAS DE PACIENTES COM FISSURA LABIAL E/OU PALATINA sob orientação do professor Dr. ALEXANDRE REZENDE VIEIRA vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba (PPGO/UFPB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPB).

Ciente dos objetivos, métodos e técnicas que serão utilizados nessa pesquisa, concordo em permitir acesso aos dados e informações necessárias para seu desenvolvimento, desde que seja assegurado o cumprimento das determinações éticas contidas nas resoluções brasileiras, a exemplo da Resolução CNS nº 466/2012; a garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes, durante e depois do desenvolvimento da pesquisa, sempre que se fizer necessário; de que não haverá nenhuma despesa para esta instituição decorrente da participação nesta pesquisa; e, no momento da pesquisa sem penalização alguma para instituição.

O referido projeto será realizado no Serviço de Fissuras Labiopalatinas do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB bem como no Centro de Referência de Atenção à Saúde – CRAS/UFPB e **só poderá ocorrer** somente a partir da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HULW.

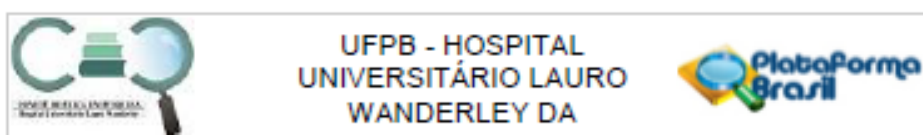
João Pessoa, 26 de Novembro de 2018.


MARIA LUCIENE WANDERLEY ALVES
Coordenadora do CRAS

Maria Luciene Wanderley Alves
Coordenadora do CRAS/UFPB

ANEXO V

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CÂNCER EM FAMÍLIAS DE PACIENTES COM FISSURA LABIAL E/OU PALATINA

Pesquisador: IONÁRIA OLIVEIRA DE ASSIS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03829018.1.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.149.655

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo do tipo coorte observacional descritivo, de caráter longitudinal a ser desenvolvido pela aluna Ionária Oliveira de Assis, do Programa de Pós Graduação em Odontologia do CSS/UFPB, sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Rezende Vieira e coorientação do Prof.Dr. Ricardo Dias de Castro. A amostra será composta por aproximadamente 277 pacientes, o que inclui 200 em tratamento e 77 que correspondem a uma estimativa de pacientes novos por ano que buscam tratamento, tratados ou em acompanhamento pós-tratamento no Serviço de Fissurados do Hospital Universitário Lauro Wanderley – UFPB e um dos seus acompanhantes, bem como de pacientes atendidos no Setor de Odontologia do Centro de Referência de Atenção à Saúde (CRAS), Campus I, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sendo esses últimos alocados no grupo controle da pesquisa. Serão excluídos aqueles que não responderem completamente à entrevista ou se recusarem a ter a saliva coletada. Os dados da pesquisa serão coletados por meio de uma entrevista realizada pela pesquisadora que utilizará um questionário formulado com perguntas referentes às condições estudadas (fendas orofaciais e câncer), bem como fatores demográficos como sexo, idade, consanguinidade familiar. Além disso, far-se-á a coleta de saliva de todo grupo estudado a fim de genotipar marcadores anônimos ao longo do genoma, para testar associação com o defeito. Para cada pessoa, se pedirá que excrete 4 mL de saliva, coletando-a em um frasco coletor com tampa, que serão congelados e mantidos em refrigeração a -20 graus para

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 58.059-900
UF: PB **Município:** JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7964 **Fax:** (83)3216-7522 **E-mail:** comitedeetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.140.055

posterior extração e quantificação do DNA por técnicas convencionais. No caso dos bebês e daquelas crianças que ainda não conseguem excretar a saliva, será colocada esponja na cavidade oral afim de que a mesma absorva a saliva e, assim, essa será despendida em frasco coletor até que se atinja os 4 ml de saliva necessários.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avallar a frequência de casos de câncer em famílias de pacientes com fissuras orofaciais, atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley, UFPB, em João Pessoa-PB

Objetivo Secundário:

Comparar a frequência de câncer em famílias do grupo de pacientes diagnosticados com fissura lábio/palatina e do grupo de pacientes não fissurados; Associar fatores demográficos e ambientais com risco de fissuras orofaciais e câncer; Associar genótipos de marcadores anônimos ao longo do genoma com risco de fissuras orofaciais e câncer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco principal na participação dessa pesquisa é o risco de se perder o anonimato em participar. Para minimizar esse risco, todos os dados serão coletados em documentos que ficarão trancados no Serviço de Fissurados do Hospital Universitário Lauro Wanderley – UFPB, João Pessoa-PB em um fichário mantido fechado a chave em uma sala de restrito acesso. Todas as versões eletrônicas dos dados dos pacientes serão mantidas em arquivos protegidos com senha, mantidos em computador de acesso restrito, também protegido por senha, e mantido em escritório fechado à chave em local de acesso restrito.

Benefícios:

Identificar fatores genéticos que estejam relacionados ao risco de câncer e presença de fissuras orais poderá permitir o desenvolvimento de estratégias e uma abordagem preventiva na identificação de grupos de risco. Assim sendo, o presente trabalho tem como finalidade contribuir para a realização de estudos populacionais maiores que investiguem a associação entre fissuras e câncer, a fim de esclarecer essa interatividade e permitir projetos preventivos em portadores dessas condições.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora fez adequações no protocolo de pesquisa conforme solicitado em parecer emitido

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.050-900
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7064 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.149.855

anteriormente por este CEP. Após adequações, a proposta está adequadamente elaborada e permite tecer julgamentos concernentes aos aspectos éticos/metodológicos envolvidos, conforme diretrizes contidas na Resolução 466/2012, do CNS/MS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados possibilitando adequada avaliação no que se refere aos aspectos éticos e metodológicos.

Recomendações:

(O)A pesquisador(a) responsável e demais colaboradores deverão **MANTER A METODOLOGIA PROPOSTA E APROVADA PELO CEP-HULW.**

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto apresenta aspectos éticos/metodológicos conforme diretrizes contidas na Resolução 466/2012, do CNS/MS. Diante do exposto, somos de parecer favorável à sua execução.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de **APROVAÇÃO** do protocolo de pesquisa, emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em reunião ordinária realizada em 12 de fevereiro de 2019.

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES PARA O(S) PESQUISADORES

. O participante da pesquisa e/ou seu responsável legal deverá receber uma via do TCLE na íntegra, com assinatura do pesquisador responsável e do participante e/ou responsável legal. Se o TCLE contiver mais de uma folha, todas devem ser rubricadas e com aposição de assinatura na última folha. O pesquisador deverá manter em sua guarda uma via do TCLE assinado pelo participante por cinco anos.

. O pesquisador deverá desenvolver a pesquisa conforme delineamento aprovado no protocolo de pesquisa e só descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade, pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

Lembramos que é de responsabilidade do pesquisador assegurar que o local onde a pesquisa será realizada ofereça condições plenas de funcionamento garantindo assim a segurança e o bem-estar dos participantes da pesquisa e de quaisquer outros envolvidos.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser apresentadas por meio de **EMENDA** ao CEP/HULW de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

O pesquisador deverá apresentar o Relatório **PARCIAL E/OU FINAL** ao CEP/HULW, por meio de

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.

Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900

UF: PB Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7964 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.149.655

NOTIFICAÇÃO online via Plataforma Brasil, para APRECIÇÃO e OBTENÇÃO da Certidão Definitiva por este CEP. Informamos que qualquer alteração no projeto, dificuldades, assim como os eventos adversos deverão ser comunicados a este Comitê de Ética em Pesquisa através do Pesquisador responsável uma vez que, após aprovação da pesquisa o CEP-HULW torna-se co-responsável.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1257028.pdf	09/01/2019 18:40:53		Acelto
Orçamento	Orcamento.docx	09/01/2019 18:34:52	IONARIA OLIVEIRA DE ASSIS	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCORRIGIDO.docx	09/01/2019 18:31:29	IONARIA OLIVEIRA DE ASSIS	Acelto
Parecer Anterior	PARECER3079196.pdf	09/01/2019 18:28:58	IONARIA OLIVEIRA DE ASSIS	Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CARTARESPOTA.pdf	09/01/2019 18:27:00	IONARIA OLIVEIRA DE ASSIS	Acelto
Folha de Rosto	ROSTO.pdf	09/01/2019 18:15:14	IONARIA OLIVEIRA DE ASSIS	Acelto
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	04/01/2019 12:33:16	IONARIA OLIVEIRA DE ASSIS	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo.docx	02/12/2018 18:01:55	IONARIA OLIVEIRA DE ASSIS	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia.pdf	02/12/2018 17:51:28	IONARIA OLIVEIRA DE ASSIS	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7964 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



Continuação do Parecer: 3.149.655

JOÃO PESSOA, 15 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE
(Coordenador(a))

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB.
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7964 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com

Página 05 de 05

APÊNDICES

APÊNDICE I

TABELAS

Tabela 3. Síndromes

Fissurados	Sindrômicos	FL	FLP	FP	Câncer
Van der Woude	9	1	8	0	4
Pierre Robin	4	0	0	4	1
Autismo	2	0	2	0	1
Down	1	0	1	0	1
Arnaud Chiari	1	0	1	0	1
Hidrocefalia	1	0	1	0	0
Microsomia hemifacial	1	0	1	0	0
Perda auditiva/defeito palpebral	1	1	0	0	1
Polidactilia e Má formação na mão	2	0	2	0	1
Encefalocele/microcefalia	1	0	1	0	1
Total	23	2	17	4	11

Tabela 4. História de Câncer por grupo.

Grupo	Câncer		Total	p valor	Frequência de câncer	
	SIM	NÃO			Único	Múltiplo
Fissurados	179 (59,1%) NS: 168 (93,9%) S: 11 (6,1%)	124 (40,9%) NS: 111 (89,5%) S: 13 (10,5%)	303	Fiss x Fam p= 0.02506 Obs: p=0.013744 excluindo-se fissurados com síndrome	127 (70,9%)	52 (29,1%)
Familiares	127 (49,7%)	129 (50,3%)	256	Fiss x Cont p= 0.16995 Obs: p=0.0283521 excluindo-se fissurados com síndrome	96 (75,6%)	31 (24,4%)
Controle	179 (64,6%)	98 (35,4%)	277	Fam x Cont: 0.000462	124 (69,3%)	55 (30,7%)
Total	485(58,0%)	351(42,0%)	836		347 (71,5%)	138 (28,5%)

Legenda. S: Sindrômicos; NS: Não Sindrômicos.

Tabela 5. História de Câncer por tipo de fissura.

Fissura	Câncer		Total	p Valor	Frequência de câncer	
	Sim	Não			Único	Múltiplo
FL	30 (57,7%)	22 (42,3%)	52	FL x FLP p=0.7609	18 (60%)	12 (40%)
FLP	129 (60%)	86 (40%)	215	FL x FP p=0.84229	95 (73,6%)	34 (26,4%)
FP	20 (55,6%)	16 (44,4%)	36	FLP x FP p=0.61531	14 (70%)	6 (30%)
Total	179 (59,1%)	124 (40,9%)	303		127 (70,9%)	52 (29,1%)

Tabela 6. Dados demográficos por tipo de fissura.

Fissuras		FL		FLP		FP	
N		52 (17,2%)		215 (70,9%)		36(11,9%)	
Sexo	F	23 (44,2%)		94 (43,7%)		18 (50%)	
	M	29 (55,8%)		121 (56,3%)		18 (50%)	
Média de Idade (em anos)		10,46		13,99		5,5	
História de fissura na família		Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
		26	25	110	103	15	20
Idade do pai ao nascimento (média em anos)		30,64		29,50		29,42	
Idade da mãe ao nascimento (média em anos)		26,52		25,53		26,47	
Fumo paterno	Sim	Não		Sim	Não	Sim	Não
	6	43		59	147	9	26
Fumo materno	Sim	Não		Sim	Não	Sim	Não
	6	45		28	187	2	33
História de câncer feminino (mama, útero, ovário)		N=16		N=54		N=10	
História de câncer TGI*		N=14		N=37		N=10	
Fumo do pai e história de câncer		N=3		N=37		N=5	
Fumo da mãe e história de câncer		N=3		N=19		N=1	

*TGI: boca, garganta, faringe, esôfago, estômago, intestino, ductos biliares, vesícula, fígado, pâncreas e reto.

Tabela 7. Distribuição da frequência de câncer pelos tipos de fissura.

Tipo de câncer	Tipo de Fissura			
	Labial	Labiopalatina	Palatina	Total
Baço	0	1(0,6%)	0	1
Boca	1(2%)	4(2,2%)	1(3,6%)	6
Cabeça	3(6%)	4(2,2%)	1(3,6%)	8
Esôfago	1(2%)	2(1,1%)	1(3,6%)	4
Estômago	2(4%)	15(8,3%)	1(3,6%)	18
Fígado	3(6%)	5(2,8%)	1(3,6%)	9
Garganta	3(6%)	8(4,4%)	4(14,3%)	15
Intestino	4(8%)	3(1,7%)	2(7,1%)	9
Leucemia	6(12%)	11(6,1%)	0	17
Mama	10(20%)	33(18,3%)	6(21,4%)	49
Olho	1(2%)	0	0	1
Ossos	1(2%)	9(5%)	1(3,6%)	11
Ouvido	0	1(0,6%)	0	1
Ovário	0	2(1,1%)	0	2
Pele	0	7(3,9%)	0	7
Próstata	3(6%)	18(10%)	2(7,1%)	23
Pulmão	1(2%)	16(8,9%)	1(3,6%)	18
Tireóide	0	6(3,3%)	0	6
Útero	6(12%)	19(10,6%)	4(14,3%)	29
Não sabe	5(10%)	16(8,9%)	3(10,7%)	24
Total	50 (19,4%)	180 (69,8%)	28 (10,8%)	258

Tabela 8. Dados gerais da história de câncer dos grupos e genotipagem do mTOR rs1010447.

<i>mTOR</i> rs1010447		Fissurados (303)			Famíliares (256)			Controles (277)			p Valor
		CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Distribuição do gene		124	108	39	101	88	29	112	82	27	Fiss X Fam p=0.9419 Fiss X Cont p=0.5268 Fam X Cont p=0.6600
Frequência de Câncer	Único	49	50	16	37	36	12	50	39	14	Fiss X Fam p=0.9873 Fiss X Cont p=0.6554 Fam X Cont p=0.7797
	Múltiplo	24	18	2	12	12	2	27	17	1	Fiss X Fam p=0.7364 Fiss X Cont p=0.7682 Fam X Cont p=0.3632
História de câncer feminino (mama, útero, ovário)		29	26	7	13	27	3	28	23	4	Fiss X Fam p=0.1096 Fiss X Cont p=0.7398 Fam X Cont p=0.1028
História de câncer TGI*		22	29	2	21	12	4	23	26	5	Fiss X Fam p= 0.0799 Fiss X Cont p=0.4813 Fam X Cont p=0.9538
Fumo da mãe		16	11	4	44	29	10	16	11	5	Fiss X Fam p=0.9882 Fiss X Cont p=0.9534 Fam X Cont p=0.8742
Fumo da mãe e história de câncer		12	6	2	22	15	4	11	8	3	Fiss X Fam p= 0.8749 Fiss X Cont p=0.8045 Fam X Cont p=0.8910
Fumo do pai		31	26	9	58	48	15	33	21	6	Fiss X Fam p=0.9703 Fiss X Cont p=0.6342 Fam X Cont p=0.6615
Fumo do pai e história de câncer		20	15	4	25	27	7	23	16	3	Fiss X Fam p=0.6866 Fiss X Cont p=0.8721 Fam X Cont p=0.4309

*TGI: boca, garganta, faringe, esôfago, estômago, intestino, ductos biliares, vesícula, fígado, pâncreas e reto.

Tabela 9. Dados gerais dos tipos de fissura e genotipagem do mTOR rs1010447.

<i>mTOR</i> rs1010447		FL (n = 52)			FLP (n = 215)			FP (n = 36)			p Valor
		CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Distribuição do gene		19	14	9	94	76	26	11	18	4	FL X FLP p=0.3882 FL X FP p= 0.1714 FLP X FP p= 0.2168
Frequência de Câncer	Único	7	4	4	37	39	11	5	7	1	FL X FLP p=0.2512 FL X FP p= 0.2437 FLP X FP p= 0.7883
	Múltiplo	3	5	1	19	9	1	2	4	0	FL X FLP p= 0.2105 FL X FP p= 0.69047 FLP X FP p= 0.2510
História de câncer feminino (mama, útero, ovário)		4	6	2	25	20	4	2	7	1	FL X FLP p= 0.4644 FL X FP p= 0.6368 FLP X FP p= 0.1896
História de câncer TGI*		4	9	0	15	14	2	3	6	0	FL X FLP p= 0.2847 FL X FP p= 0.8989 FLP X FP p= 0.4545
Fumo da mãe		2	1	0	13	9	4	1	1	0	FL X FLP p= 0.2016 FL X FP p= 0.1537 FLPXFP p= 0.08266
Fumo da mãe e história de câncer		0	1	0	11	5	2	1	0	0	FL X FLP p= 0.8475 FL X FP p= 0.6456 FLP X FP p= 0.3152
Fumo do pai		2	1	2	28	19	6	1	6	1	FL X FLP p=0.5026 FL X FP p= 0.6376 FLP X FP p= 0.1766
Fumo do pai e história de câncer		1	1	0	18	11	3	1	3	1	FL X FLP p= 0.1878 FL X FP p= 0.4519 FLP X FP p= 0.5765

*TGI: boca, garganta, faringe, esôfago, estômago, intestino, ductos biliares, vesícula, fígado, pâncreas e reto.

Tabela 10. Dados gerais dos tipos de fissura e genotipagem do IRE1 rs196929.

IRE1 rs196929		FL (n = 52)			FLP (n = 215)			FP (n = 36)			p Valor
		CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Distribuição do gene		20	16	1	71	56	21	8	9	3	FL X FLP p= 0.1549 FL X FP p= 0.1893 FLP X FP p= 0.7866
Frequência de Câncer	Único	5	7	0	32	25	7	2	7	1	FL X FLP p= 0.3091 FL X FP p= 0.3462 FLP X FP p= 0.1640
	Múltiplo	4	4	0	13	9	2	4	0	0	FL X FLP p= 0.6322 FL X FP p= 0.08326 FLP X FP p= 0.2209
História de câncer feminino (mama, útero, ovário)		4	6	0	23	17	4	4	4	0	FL X FLP p= 0.36282 FL X FP p= 0.67137 FLP X FP p= 0.6217
História de câncer TGI*		5	6	0	12	9	4	4	0	0	FL X FLP p= 0.3010 FL X FP p= 0.0565 FLP X FP p= 0.1518
Fumo da mãe		1	2	1	11	8	1	0	1	0	FL X FLP p= 0.3198 FL X FP p= 0.6592 FLP X FP p= 0.4965
Fumo da mãe e história de câncer		0	2	0	9	4	1	0	1	0	FL X FLP p= 0.1488 FL X FP p=0 FLP X FP p= 0.3425
Fumo do pai		3	2	0	20	14	5	0	4	0	FL X FLP p= 0.6955 FL X FP p= 0.0577 FLPXFP p= 0.0467
Fumo do pai e história de câncer		1	1	0	13	9	3	0	2	0	FL X FLP p= 0.8439 FL X FP p= 0.2482 FLP X FP p= 0.2078

*TGI: boca, garganta, faringe, esôfago, estômago, intestino, ductos biliares, vesícula, fígado, pâncreas e reto.

APÊNDICE II
QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

Pesquisa: CÂNCER EM FAMÍLIAS DE PACIENTES COM FISSURA LABIAL E/OU PALATINA.

Nº

Questionário

01. Idade:

02. Indique seu sexo

☐ Masculino ☐ Feminino

03. Grau de escolaridade

☐ Fundamental ☐ Fundamental incompleto ☐ Médio
☐ Médio incompleto ☐ Superior ☐ Superior incompleto
☐ Analfabeto

04. Estado civil

☐ Solteiro ☐ Casado ☐ Viúvo

05. Tem algum grau de parentesco com seu cônjuge?

☐ Sim ☐ Não

06. Se a resposta for positiva, qual o grau?

07. Tem filhos?

☐ Sim ☐ Não

08. Quantos filhos?

09. Você apresenta algum tipo de fissura orofacial?

☐ Sim ☐ Não

10. Qual tipo?

☐ Fenda labial

☐ Fenda palatina

☐ Fenda labiopalatina

11. Realizou cirurgia reparadora?

☐ Sim

☐ Não

12. Há quanto tempo?

13. Tem algum caso na família com fenda orofacial?

☐ Sim

☐ Não

14. A sua mãe fumou durante a sua gestação?

☐ Sim

☐ Não

15. O seu pai fumava quando sua mãe estava grávida?

☐ Sim

☐ Não

16. Quantos anos seu pai tinha ao você nascer?

17. E a sua mãe? Quantos anos tinha quando você nasceu?

18. Apresenta algum caso de câncer na família?

☐ Sim

☐ Não

19. Se a resposta anterior foi positiva, especifique o tipo de câncer.

20. Cidade de origem.

21. Onde mora?

APÊNDICE III
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Universidade Federal da Paraíba
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Prezado (a),

Você está sendo convidado a participar de pesquisa intitulada **“CÂNCER EM FAMÍLIAS DE PACIENTES COM FISSURA LABIAL E/OU PALATINA”** que está sendo desenvolvida por Ionária Oliveira de Assis, aluna do Curso de Pós-Graduação em Nível de Mestrado em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre Vieira Rezende. Antes de decidir sobre sua participação é importante que entenda o motivo de a mesma estar sendo realizada e como ela se realizará, portanto, leia atentamente as informações que seguem e se tiver alguma dúvida, consulte a pesquisadora responsável ou o Comitê de Ética em Pesquisa.

O objetivo deste estudo é avaliar a frequência de casos de câncer em famílias de pacientes com fissuras orofaciais, atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley, UFPB, em João Pessoa-PB comparando com um grupo controle formado pelos pacientes atendidos pelo CRAS (Centro de Referência de Atenção à Saúde), bem como testar marcadores que possam estar relacionados com fendas e câncer. Tem como justificativa a necessidade de estudos populacionais maiores que investiguem a associação entre fissuras e câncer, a fim de esclarecer essa interatividade e permitir projetos preventivos em portadores dessas condições.

Esse estudo será realizado com portadores de fissuras orofaciais e seus familiares, bem como com pessoas não portadoras dessa condição. Sua participação neste trabalho consiste em responder a um questionário com dados sócio familiares, questões sobre histórico familiar de câncer, bem como, fornecer sua saliva para que seja feita a extração do DNA. São previstos riscos mínimos durante a sua participação nesse estudo. A coleta de dados será realizada exclusivamente por uma pesquisadora, da mesma forma, para evitar a identificação de suas respostas, os questionários serão depositados na sua presença, em envelope único. Já o TCLE será recolhido em outro envelope, separado dos questionários. Ainda assim, caso venha a sentir qualquer constrangimento ou desconforto diante das perguntas, a mesma será imediatamente interrompida.

Apesar da existência de riscos, os benefícios oferecidos serão superiores. Os resultados dessa pesquisa possibilitarão obter dados mais precisos a respeito da correlação entre as fissuras orofaciais e câncer. Ao final do estudo espera-se estabelecer uma relação entre fissuras de lábio e/ou palato e história de câncer na família. Além disso, os resultados poderão ser disseminados não só para a comunidade científica, mas principalmente para a população em geral.

A equipe da pesquisa estará permanentemente, mesmo após o encerramento do estudo, à sua disposição para prestar informações sobre a

frequência de câncer em famílias de pacientes com fissura labial e/ou palatina. Mesmo após o encerramento do estudo a equipe da pesquisa prestará quaisquer esclarecimentos ou orientações que você julgar necessários em relação ao tema abordado.

Informamos que a sua participação é voluntária e, portanto, você não é obrigado a fornecer as informações e/ou colaborar com os pesquisadores, nem tampouco receberá nenhuma remuneração por isso. Você tem o direito de decidir não participar do estudo, ou de desistir de participar a qualquer momento, sem nenhum dano, prejuízo ou constrangimento.

Todas as informações obtidas em relação a esse estudo permanecerão em absoluto sigilo, assegurando proteção de sua imagem, de sua privacidade e respeitando valores morais, culturais, religiosos, sociais e éticos. Os resultados dessa pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou publicações científicas, porém sua identidade não será divulgada nestas apresentações, nem serão utilizadas quaisquer imagens ou informações que permitam a sua identificação.

Este documento foi elaborado em duas vias de igual conteúdo, que deverão ser rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo participante da pesquisa, pela aluna pesquisadora e pela pesquisadora responsável. Você receberá uma das vias e a outra ficará arquivada com os responsáveis pela pesquisa.

Não é previsto que você tenha nenhuma despesa na participação nesta pesquisa ou em virtude da mesma, todavia, caso você venha a ter qualquer despesa em decorrência de sua contribuição neste estudo, será plenamente ressarcido. Ressaltamos ainda que, no caso de eventuais danos acarretados pela participação no presente estudo, você será indenizado.

Declaramos que o desenvolvimento desta pesquisa seguirá rigorosamente todas as exigências preconizadas pela Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, especialmente aquelas contidas no item IV.3. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos ou sobre o desenvolvimento deste estudo você pode entrar em contato com a pesquisadora responsável, Ionária Oliveira de Assis, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Após ter sido informado sobre a finalidade da pesquisa **“CÂNCER EM FAMÍLIAS DE PACIENTES COM FISSURA LABIAL E/OU PALATINA”** e após ter lido os esclarecimentos prestados anteriormente no presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, eu _____ estou plenamente de acordo em participar do presente estudo, permitindo que os dados obtidos sejam utilizados para os fins da pesquisa, estando ciente que os resultados serão publicados para difusão e progresso do conhecimento científico e que minha identidade será preservada. Estou ciente também que receberei uma via deste documento. Por ser verdade, firmo o presente.

João Pessoa – PB ____/____/____.

Assinatura do Participante da Pesquisa



Impressão datiloscópica

Assinatura da Pesquisadora

Contato da pesquisadora responsável:

Ionária Oliveira de Assis
Endereço: Pós-Graduação em Odontologia
Campus I, UFPB, João Pessoa – PB
Telefone: (83) 99988.5562
e-mail da pesquisadora: ionariassis@gmail.com

Contato do Comitê de Ética em Pesquisa do HULW

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley – 2º andar, Campus I,
Cidade Universitária, João Pessoa – PB
Telefone: (83) 3216.7964/ 3216.7955
Horário de Funcionamento: 8h às 12h e das 13h às 17h.
e-mail do Comitê: comitedeetica.hulw2018@gmail.com

APÊNDICE IV
TERMO DE ASSENTIMENTO (CRIANÇAS ACIMA DE 6 ANOS)

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia – PPGO

TERMO DE ASSENTIMENTO

João Pessoa, ____/____ de 201__

Você está sendo convidado/a para participar da pesquisa: **CANCER EM FAMÍLIAS DE PACIENTES COM FISSURA LABIAL E/OU PALATINA.**

Seus pais permitiram que você participasse.

Com esta pesquisa queremos que colabore conosco permitindo seja feita a coleta de sua saliva.

As crianças que irão participar desta pesquisa têm de 0 a 19 anos de idade. Caso não queira participar da pesquisa, é um direito seu e não terá nenhum problema em recusar ou desistir.

A qualquer momento você pode nos procurar pelo telefone (83) 999885562 ou pelo e-mail ionariassis@gmail.com da pesquisadora Ionária Oliveira de Assis. Ao persistirem as dúvidas sobre os seus direitos como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba pelo telefone (83) 32160-7964.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der.

Os resultados da pesquisa vão ser divulgados, mas sem identificar as crianças que participaram.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar. Eu escrevi os telefones na parte de cima deste texto.

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Eu _____ aceito participar da pesquisa **CANCER EM FAMÍLIAS DE PACIENTES COM FISSURA LABIAL E/OU PALATINA**. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar com raiva se eu desistir. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

João Pessoa, ____ de _____ de _____.



Assinatura do menor ou impressão
dactiloscópica

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Contato com o Pesquisador (a) responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o (a) pesquisador (a) Ionária Oliveira de Assis. Telefone: (83) 999885562 ou para o Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley -Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW – 2º andar. Cidade Universitária. Bairro: Castelo Branco – João Pessoa - PB. CEP: 58059-900.

E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com - Campus I– Fone: 32160-7964