



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

VANESSA DE MELO CAVALCANTI DANTAS

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS rs2228570 E rs1544410 DO
GENE *VDR* NA OCORRÊNCIA DE FISSURAS LABIOPALATINAS NÃO
SINDRÔMICAS

JOÃO PESSOA

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

VANESSA DE MELO CAVALCANTI DANTAS

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS rs2228570 E rs1544410 DO
GENE *VDR* NA OCORRÊNCIA DE FISSURAS LABIOPALATINAS NÃO
SINDRÔMICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof^ª. Dra. Darlene Camati Persuhn

JOÃO PESSOA

2017

Catálogo na publicação
Setor de Catalogação e Classificação

D192a Dantas, Vanessa de Melo Cavalcanti.
Análise da influência dos polimorfismos rs2228570 e
rs1544410 do gene *VDR* na ocorrência de fissuras labiopalatinas
não síndrômicas / Vanessa de Melo Cavalcanti Dantas. - João
Pessoa, 2017.

99 f. : il. -

Orientadora: Darlene Camati Persuhn.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Biologia Celular e Molecular. 2. Fissuras orofaciais.
3. Estresse Oxidativo. 4. Vitamina D. 5. Vitamina D - Receptor.
I. Título.

UFPB/BC

CDU – 576+577.2(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Dissertação de Mestrado avaliada em 18/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof.ª Dra. Darlene Camati Persuhn
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da
Paraíba
Orientadora

Prof.ª Dra. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo

Prof.ª Dra. Daniela Priscila Marchi Salvador
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da
Paraíba
Examinador Interno

Prof. Dr. Clayton Zambeli Oliveira
Universidade Federal da Paraíba
Membro Suplente Externo

Prof.ª Dra. Krystyna Gorlach Lira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da
Paraíba
Membro Suplente Interno

DEDICATÓRIA

À Deus, por ser o autor da vida, dono de todo entendimento dado ao homem, por Seu amor incondicional aos seus filhos, que me inspira e me discerne na busca dos meus sonhos.

“Em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas o Senhor determina os seus passos”

(BÍBLIA, Provérbios 16.9).

EPÍGRAFE

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) pelo acolhimento que me foi prestado por todo esse período de mestrado e à todos os professores do programa pelos ensinamentos e conhecimentos que foi repassado através das disciplinas lecionadas.

Aos servidos do Departamento de Biologia Molecular da UFPB.

À professora Dra. Darlene Camati Persuhn pela oportunidade que me foi dada, pela confiança e por me mostrar que sempre é possível fazer o meu melhor e superar meus limites.

À toda equipe do Setor Fissurados por terem me acolhido, como também pelas amizades construídas e em especial, agradeço ao Dr. Paulo Germano, pela autorização da realização deste trabalho e por todo o conhecimento compartilhado, e à enfermeira Lindalva pela ajuda no recrutamento dos trios.

À todas as crianças fissuradas e seus pais que gentilmente aceitavam participar deste trabalho e pelos ensinamentos que me foram passados, que levarei para a vida.

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos colegas de laboratório Mayara Karla dos Santos Nunes, Rayner Anderson Ferreira do Nascimento, Camila Maria Cordeiro Dias, Tamires Gonçalves de Jesus e Clara Soeiro Maas, pelas contribuições na execução do trabalho e por sempre terem me ajudado em vários momentos.

Ao professor Dr. Ricardo Della Colletta pelas contribuições científicas e apoio dados em toda a construção deste trabalho que foram de fundamental importância.

Aos colegas da turma 2015.1 do mestrado pelo convívio, amizades construídas que ficará além do mestrado e por tantos momentos compartilhados. Sou muito grata a todos por tudo que vivemos juntos nessa caminhada.

À minha família, em especial à minha mãe Sandra, meu pai Valdir e ao meu irmão Victor que sempre me apoiaram e me ajudaram a seguir com os meus objetivos e pelo amor que foi a base para seguir com minhas conquistas.

Ao meu marido Hugo Chagas Dantas por me auxiliar com seus conhecimentos na área da computação e tecnologia, por sempre acreditar na minha capacidade de ir além dos meus limites, pelo apoio diário e por passar a sonhar os meus sonhos.

E a todos os amigos da minha vida que por tantas vezes trouxeram uma palavra de conforto e de auto estima para que chegasse até aqui.

RESUMO

As fissuras labiopalatinas podem ser classificadas, com base nas estruturas afetadas, em fissura labial (FL), fissura palatina (FP) e fissura labiopalatina (FLP), todas podendo constituir anomalias sindrômicas ou não-sindrômicas, apresentando vários fatores de risco. A vitamina D é considerado um hormônio esteróide de grande importância por estar envolvido em processos fisiológicos fundamentais. A insuficiência de vitamina D está associada a várias complicações na gravidez incluindo pré-eclâmpsia e nascimento prematuro, sugerindo um papel importante desta vitamina na manutenção da gravidez e desenvolvimento fetal. O gene *VDR* está localizado no braço longo do cromossomo 12 e mais de 470 polimorfismos foram identificados no gene *VDR* humano, dentre eles o rs2228570 e rs1544410. O objetivo deste trabalho foi determinar as frequências alélicas e genótípicas e as associações de rs2228570 e rs1544410 com a suscetibilidade para o desenvolvimento de FL/P e FP. Foi desenvolvido um estudo de caso controle, envolvendo 127 duplas de pacientes atendidos no Serviço de Fissurados do Hospital Universitário Lauro Wanderley, sendo 74 FL/P e 53 FP com suas respectivas genitoras, e 82 duplas de crianças e genitoras saudáveis atendidas no Hospital Cândida Vargas. O DNA genômico de crianças e genitoras foi obtido a partir de células de mucosa oral. Os genótipos foram identificados pela técnica de Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP) e analisados utilizando o teste qui-quadrado. A diferença da idade média das mães apresentou diferença entre grupo controle e grupo FP. A porcentagem de filhos fissurados que apresentaram ter histórico familiar de fissuras comparado ao controle apresentou significância ($p= 0,0001$). A distribuição genotípica e frequência alélica de rs2228570 tanto no grupo de genitoras quanto de afetados não foi diferente do grupo controle. Para o polimorfismo rs1544410 a comparação entre crianças do grupo FP e controle mostrou diferença significativa na distribuição genotípica ($p = 0,017$) e frequência alélicas apresentou ($p= 0,008$) com predominância do alelo b no grupo FP. Não foram encontradas diferenças significantes para os genótipos e frequência alélica de rs1544410 no grupo de genitoras. Os resultados deste estudo sugerem que o alelo b do rs1544410 pode atuar como fator de risco de desenvolvimento e que o genótipo BB pode atuar como fator protetor para FP.

Palavras-chave: Fissuras orofaciais, Estresse Oxidativo, Vitamina D, Receptor da Vitamina D.

ABSTRACT

The cleft lip and palate can be classified according to the affected structures in CL, CP or CLP (combination of both), can be classified into syndromic or non-syndromic fissures, presenting several risk factors. Vitamin D is considered a steroid hormone of great importance because it is involved in fundamental physiological processes. Vitamin D insufficiency is associated with several complications in pregnancy including pre-eclampsia and premature birth, suggesting an important role of this vitamin in maintaining pregnancy and fetal development. The *VDR* gene is located on the long arm of chromosome 12 and more than 470 polymorphisms were identified in the human *VDR* gene, among them rs2228570 and rs1544410. The objective of this work was to determine the allelic and genotypic frequencies and the associations of rs2228570 and rs1544410 with the susceptibility for the development of CL/P and CP. A control case study was used, involving 127 double tests of patients attended by the Lauro Wanderley University Hospital, being 74 CL/P and 53 CP with their respective mothers, and 82 healthy doublets attended at the Hospital Cândida Vargas. Genomic DNA from children and mothers was obtained from oral mucosal cells. The genotypes were identified by the Restriction Fragment Length technique (PCR-RFLP) and analyzed using the chi-square test. The difference of the mean age of the mothers presented difference between the control group and the CP group. The percentage of fissured children who presented a family history of clefts compared to control presented significance ($p = 0.0001$). The genotypic distribution and allelic frequency of rs2228570 in mothers groups and the affected groups was not different from the control group. For the rs1544410 polymorphism the comparison between the children of the CP and control groups showed a significant difference in the genotypic distribution ($p = 0.017$) and allele frequency presented ($p = 0.008$) with a predominance of the b allele in the FP group. No significant differences were found for genotypes and allelic frequency of rs1544410 in the mother group. The results of this study suggest that the b allele of rs1544410 may act as a risk factor for development and that the BB genotype may act as a protective factor for CP.

Keywords: Cleft lip and palate, Oxidative Stress, Vitamin D, Vitamin D Receptor.

LISTA DE ABREVIATURAS

CC	Grupo de Crianças Controle
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CL/P	Grupo de Crianças com Fissura Labial e Labiopalatina
CP	Grupo de Crianças com Fissura Palatina
DBP	Proteína ligadora da vitamina D
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
eNOS	Óxido nítrico endotelial sintase
ER	Retículo Endoplasmático
ERNs	Espécies reativas derivadas do nitrogênio
EROs	Espécies reativas derivadas do oxigênio
FL	Fissura Labial
FL/P	Fissura labial com ou sem palato
FL/PNS	Fissura Labiopalatina não sindrômica
FLP	Fissura Labiopalatina
FP	Fissura Palatina
GC	Grupo Controle e Grupo de Genitoras Controle
GL/P	Grupo de Fissuras Labiais e Labiopalatinas e Grupo de Genitoras Labiais e Labiopalatinas
GP	Grupo de Fissura Palatina e Grupo de Genitoras de Fissura Palatina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
SNP	Single Nucleotide Polimorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
SOD	Superóxido dismutase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UVB	Radiação ultravioleta B
VDR	Vitamin D receptor (Receptor da Vitamina D)
<i>VDR</i>	Gene do receptor da vitamina D

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Tipos de fissuras.....	01
Fig. 2. Desenho esquemático da classificação de fissuras labiopalatinas.....	03
Fig. 3. Desenho de alguns subtipos de fissuras palatinas isoladas e fissura da úvula.....	03
Fig. 4. Estrutura do gene <i>VDR</i> e localização dos principais polimorfismos.....	12
Fig. 5. Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata.....	19

LISTA DE TABELAS (DISSERTAÇÃO)

Tabela 1. Frequência dos fatores ambientais do grupo controle (GC) e grupo teste (GT).....	20
Tabela 2. Resultado do Equilíbrio Hardy-Weinberg para rs2228570 e rs1544410.....	22
Tabela 3. Análise dos genótipos rs2228570 em genitoras.....	23
Tabela 4. Análise dos genótipos rs2228570 em crianças.....	23
Tabela 5. Análise dos genótipos rs1544410 em genitoras.....	24
Tabela 6. Análise dos genótipos rs1544410 em crianças.....	25

LISTA DE TABELAS (ARTIGO)

Tabela 1. Análise do genótipo rs2228570 em genitoras e crianças.....	36
Tabela 2. Análise do genótipo rs2228570 em genitoras e crianças.....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Fissuras labiais e/ou palatinas e sua classificação.....	01
1.2	Epidemiologia de fissuras orofaciais no Brasil e no Mundo.....	04
1.3	Fatores de risco para fissuras orofaciais.....	04
1.3.1	Idade Materna.....	04
1.3.2	Tabagismo.....	05
1.3.3	Álcool.....	05
1.3.4	Outros fatores.....	06
1.3.5	Dieta.....	06
1.4	Estresse Oxidativo.....	08
1.5	Vitamina D.....	09
1.5.1	Metabolismo da Vitamina D.....	09
1.5.2	Importância da Vitamina D como antioxidante.....	11
1.6	Definição de Polimorfismo Genético.....	11
1.7	O gene do receptor da vitamina D e polimorfismos.....	12
2	OBJETIVO.....	15
2.1	Objetivos Específicos.....	15
3	METODOLOGIA.....	16
3.1	População e Amostra.....	16
3.2	Aspéctos Éticos.....	16
3.3	Análise Molecular.....	17
3.3.1	Coleta de Amostras.....	17
3.3.2	Isolamento do DNA.....	17
3.3.3	Análise do polimorfismo rs2228570.....	17
3.3.4	Análise do polimorfismo rs1544410.....	18
3.4	Avaliação de fatores de risco ambientais durante o período gestacional.....	19
3.5	Análise Estatística.....	19
4	RESULTADOS.....	20
5	DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÃO.....	31
7	ARTIGO.....	32
	REFERÊNCIAS.....	43
	APÊNDICES	
	ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fissuras labiais e/ou palatinas e sua classificação

As fissuras podem ser classificadas, com base nas estruturas afetadas, em fissura labial (FL), fissura palatina (FP) ou a combinação de ambas (fissura labial e palatina ou FLP) (Fig. 1). Estes estão entre os defeitos congênitos mais comuns e as malformações congênitas mais frequentes da área de cabeça e pescoço (WHO, 2002; BHASKAR; MURTHY; BABU, 2011), podendo ser divididas em fissuras síndrômicas, quando são associadas a outras malformações congênitas, ou não-síndrômicas, quando essas fissuras ocorrem isoladamente (STANIER; MOORE, 2004).

As fissuras labiais e/ou palatinas não-síndrômicas (FL/PNS) são anomalias congênitas isoladas e são caracterizadas por regiões de descontinuidade no lábio e/ou palato, devido a uma ausência de fusão de um ou mais dos processos faciais embrionários. Podem ser restritas ao lábio superior, restritas ao palato ou envolver, simultaneamente, as duas estruturas. A FL é o resultado da falta de fusão parcial ou total entre o processo nasal medial e os processos maxilares laterais, enquanto a falta de união dos processos palatinos é responsável pela FP (CARINCI et al., 2007).

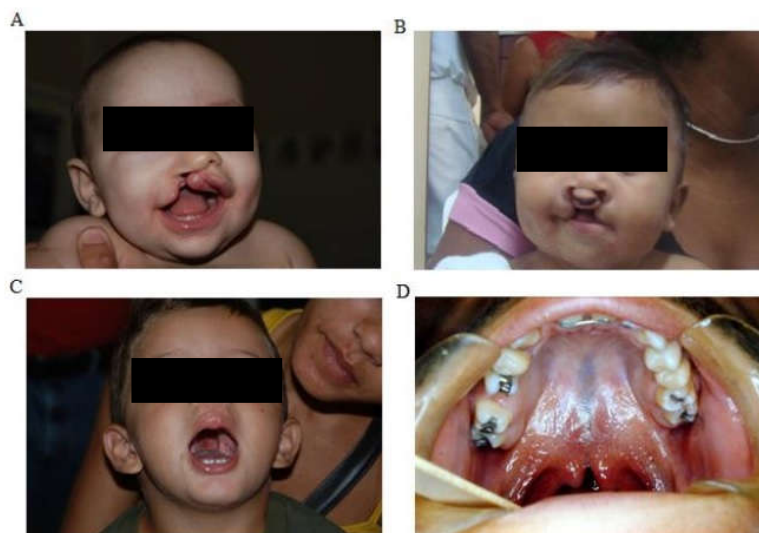


Fig. 1. Tipos de fissuras: A) Fissura labial unilateral; B) Fissura labial bilateral; C) Fissura palatina; D) Detalhe de fissura de palato. (Fonte: BRITO, 2011)

Embriologicamente, as fissuras devem ser distinguidas em FL/P e FP isolada, uma vez que o desenvolvimento de ambas é distinto. O desenvolvimento embrionário do palato ocorre entre a quarta e 12^a a 13^a semanas de vida e durante esse período, a morfologia da face é formada. Entre a quinta e a sétima semana, os processos maxilares desenvolvem-se e o lábio superior é formado pela união dos processos maxilares e nasais internos. Quando as proeminências nasais internas se fundem, formam o segmento intermaxilar, originando os componentes labial, maxila ou gengival e palatino (palato primário) (DUARTE; LEAL, 1999; AFSHAR; BRUGMANN; HELMS, 2012).

As FP podem incluir o palato mole, palato duro e alvéolo e o grau de fissura do palato é uma consequência do ponto do desenvolvimento fetal no qual a formação foi interrompida. A fusão palatina primária é geralmente completa durante a quarta à oitava semana de gestação, enquanto o palato secundário inicia sua formação durante a 8^a semana, com conclusão na 12^a semana. Esta diferença de tempo entre a formação do primário e secundário é uma das razões para considerar FL/P e FP como apresentar diferença no desenvolvimento das deformidades (MARAZITA; MOONEY, 2004; VAN AALST; KOLAPPA; SADOVE, 2008; FLINT et al., 2010).

Crescentes evidências sugerem a influência de vários genes e fatores ambientais no risco de desenvolvimento de fissuras labiais e/ou palatinas, podendo ser fatores isolados e interações entre eles em vias biológicas complexas. Pelo fato das fissuras surgirem no início do desenvolvimento embrionário, esta possui uma etiologia complexa com contribuições genética e ambiental (MANGOLD et al., 2010; DIXON et al., 2011).

O paciente com FL/P apresenta comprometimento na fala, audição, aparência e também demonstra danos psicológicos, o que pode levar grandes dificuldades na saúde e na integração social, são frequentemente necessárias cirurgias, bem como tratamento ortodôntico, fonoterápico e psicológico (BERK; MARAZITA, 2002; MOSSEY et al., 2009).

A classificação das FL/P é feita da seguinte forma, nomeadas segundo o forame incisivo, limite entre o palato primário e secundário: fissuras pré-forame incisivo, podendo ser unilateral (direita ou esquerda, completa ou incompleta), bilateral (completa ou incompleta) e mediano (completa ou incompleta); fissuras transforame incisivo, podendo ser do tipo unilateral (direita ou esquerda) e bilateral e fissuras pós-forame incisivo. Já a fissura palatina isolada ou pós-forame ainda é dividida da seguinte forma: transforame unilateral (completa ou incompleta), bilateral (completa ou incompleta) e submucosa. Porém, ainda há a classificação de um quarto grupo, no qual encontram-se as fissuras faciais raras, que são desvinculadas do palato primário e secundário, como a oblíqua, transversa, nasocular, fissuras do lábio inferior, da mandíbula,

do nariz e a fissura na úvula (Figs. 2 e 3) (SPINA et al., 1972; SILVA FILHO et al., 1992; BURG et al., 2016).

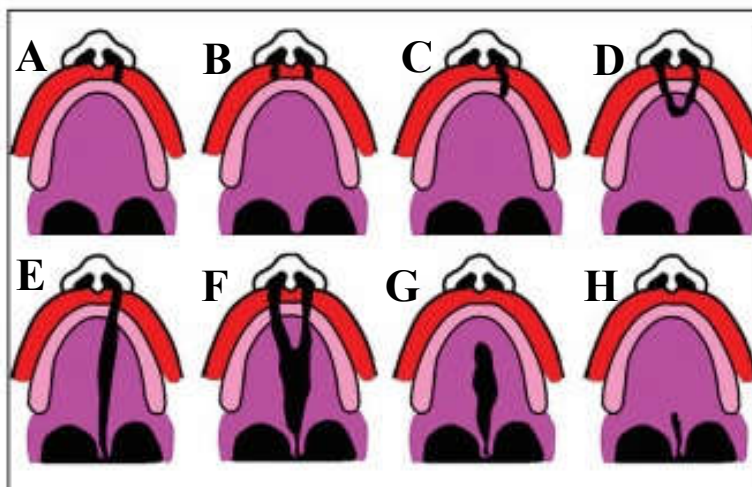


Fig. 2. Desenho esquemático da classificação de fissuras labiopalatinas: A) fissura pré-forame unilateral incompleta; B) fissura pré-forame bilateral incompleta; C) fissura pré-forame unilateral completa, D) fissura pré-forame completa bilateral; E) fissura transforame unilateral; F) fissura transforame bilateral; G) fissura pós-forame completa; H) fissura pós-forame incompleta. (Fonte: Adaptado de CYMROT et al., 2010)

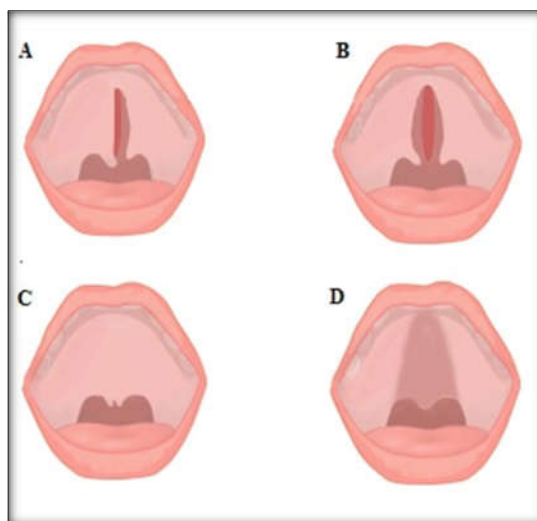


Fig. 3. Desenho de alguns subtipos de fissuras palatinas isoladas e fissura da úvula: A) Fissura palatina unilateral; B) fissura palatina bilateral; C) fissura na úvula, D) fissura palatina submucosa. (Fonte: Adaptado de BURG et al., 2016)

1.2 Epidemiologia de fissuras orofaciais no Brasil e no Mundo

As fissuras FL/P apresentam-se como a anomalia congênita mais frequente na face e de cada 700 recém-nascidos, aproximadamente 1 nasce com essa anomalia em todo o mundo, podendo variar de acordo com a área geográfica, sexo e a situação socioeconômica (LOFFREDO et al., 1994; CHRISTENSEN, 2002; MURRAY, 2002). A FP encontra-se como a mais comum dentre as FLP, afetando de 1 a 25 recém nascidos a cada 10.000 nascimentos em todo o mundo (PARKER et al., 2010; MAI et al., 2014).

A população asiática apresenta alta prevalência de FL/P, com incidência 2,1 para cada 1.000 nascimentos, enquanto que em chineses há 1,4 para cada 1.000 recém-nascidos. Na África, onde há a menor prevalência, é de 1/2.500 nascidos vivos (GORLIN; COHEN JR; HENNEKAM, 2001; DIXON et al., 2011). Em populações europeias, a incidência é, em média de 1 caso para 1.000 nascimentos e em nativos americanos a incidência de casos de crianças nascidas com fissuras é considerada também alta (3,6:1.000) (GORLIN; COHEN JR; HENNEKAM, 2001).

Já para FP, levando em consideração 10.000 nascimentos, a média europeia é de 10 casos, nativos americanos a incidência é de 5 casos, na África a é de 2 casos, na população asiática essa média de incidência é de 3 casos (MOSSEY; CATILLA, 2003; MAI et al., 2014).

Dados de registro epidemiológico de base hospitalar apontam que a prevalência de FLP no Brasil varia de 1,2/1000 a 3/1000 nascimentos, dependendo da região e do tipo de fenda e a prevalência no Nordeste FL/P é de 9,72/10 mil nascidos vivos, e para as FP 2,41/10 mil nascidos vivos (CASTILLA; LOPEZ-CAMELO; PAZ, 1995; RIBEIRO-RODA; LOPES, 2008).

1.3 Fatores de risco para fissuras orofaciais

1.3.1 Idade materna

A idade materna tem sido apontada como uma variável que influencia na ocorrência das fissuras. Há relato de ocorrência de FL/P em mães com idade variando entre 25-29 anos (FORRESTER; MERZ, 2004) assim como em mães com idade abaixo de 20 anos (DEROO; GAUDINO; EDMONDS, 2003). Outros estudos apontam também para o aumento de chance de prole com FP em mães com idade superior a 35 anos (SHAW et al., 1998; VALLINO-NAPOLI; RILEY; HALLIDAY, 2006; DAI et al., 2010).

1.3.2 Tabagismo

A nicotina, um componente tóxico do cigarro, é um vaso constritor que no período gestacional diminui o aporte sanguíneo ao feto, podendo prejudicar no seu desenvolvimento, assim como o monóxido de carbono, que ao se combinar com a hemoglobina, pode diminuir a oferta de oxigênio aos tecidos embrionários e fetais, causando uma possível hipóxia (LAMBERS; CLARK, 1996; WERLER, 1997; LITTLE; CARDY; MUNGER, 2004).

Estudos relatam que o hábito de fumar durante a gestação pode trazer alterações no desenvolvimento do tubo neural. Além disso, Shaw et al. (2009) associaram o fumo durante a gravidez a um risco aumentado de FL/P em um estudo que utilizaram medidas objetivas de fumo com base nos níveis séricos de cotinina (um metabólito da nicotina) no tempo médio da gestação das mães e os resultados foram comparados com dados das mães que geraram crianças com fissuras orofaciais ou alguma outra malformação congênita mostrando um aumento do risco de 2,1 vezes quando o bebê é exposto a fumaça.

Evitar a exposição ao fumo antes da gravidez ou nas primeiras semanas gestacional pode evitar entre 310 e 550 casos de fendas orofaciais a cada ano nos Estados Unidos. Embora as causas da maioria das fissuras orofaciais sejam desconhecidas, as evidências de que o ato de fumar no início da gravidez pode levar ao nascimento de crianças com fissuras orofaciais destaca uma importante oportunidade de prevenção para melhorar a saúde dos lactentes. (HONEIN et al., 2014). Devido as altas taxas de exposição ao tabagismo entre mulheres em idade reprodutiva, estima-se que cerca de 11% a 12% de todas as FL/P poderiam ser evitadas com a interrupção do tabagismo (MITCHELL et al., 2002).

1.3.3 Álcool

Estudos mostram que mulheres gestantes que fazem uso de álcool aumentam 2,8 vezes a chances de ter uma criança com FP. Consumo excessivo de álcool em grandes doses durante no primeiro trimestre de gestação já foi mostrado como fator de risco para FL/P (SHAW; LAMMER, 1999; LORENTE et al., 2000; BOYLES et al., 2010).

A ingestão de álcool durante o período gestacional tem sido associada ao aumento de risco para ocorrência de FL/P. Esta associação parece estar relacionada ao tipo de bebida, dose e frequência e quando o álcool é combinado com outros fatores, como o tabaco, drogas, e também a fatores sócio geográficos o risco de FL/P e para FP é ainda maior (MEYER et al., 2003; KAWALEC et al., 2015).

A utilização de doses maiores em menor frequência parece ser mais prejudicial ao desenvolvimento fetal do que maior número de exposições com pouca dosagem. Isso provavelmente é devido aos picos de concentrações ao qual os tecidos em desenvolvimento serão expostos (GLADSTONE; NULMAN; KOREN, 1996; MAIER; WEST, 2001).

1.3.4 Outros fatores

Exposições à solventes (hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos utilizados na limpeza), o uso de drogas ilícitas, medicamentos corticosteróides, benzodiazepínicos, antiepiléticos (fenitoína e ácidos valpróico) usados durante a gestação podem ter um grande efeito sobre uma maior predisposição de FL/P e FP. Outra questão bastante importante é a saúde e presença de infecções nas mulheres durante a gravidez (LEITE; PAUMGARTTEN; KOIFMAN, 2005; KAWALEC et al., 2015).

Outros estudos têm evidenciado o risco de fissuras orofaciais em exposição a agentes químicos, como Cordier et al. (1992) em um estudo de caso-controle realizado na França demonstraram um aumento significativo para FL/P quando a gestante se expôs a solventes. Chevrier et al. (2006) demonstraram que tanto FL/P quanto FP estão associadas à exposição de oxigenados, e dentre eles, ésteres, cetonas, aldeídos e petróleo. Lorente et al. (2000) mostraram a exposição a tricloroetileno e o aumento do risco de gestante ter uma criança com FP.

Garcia e Almeida (1991) demonstraram que mães em contato direto com agrotóxicos em atividades agrícolas no primeiro trimestre da gravidez e anterior a gravidez apresentaram risco aumentado de terem bebês com FL/P.

Em uma metanálise, Hwang e Jaakkola (2003) forneceram evidência de que o uso de substâncias contendo cloração para desinfecção pode ser fator de risco para defeitos do nascimento, defeitos do tubo neural e do sistema urinário. Assim como também Klotz e Pynch (1999) encontrou significância estatística na associação de uso desses produtos em água e nascimentos de bebês com defeitos do tubo neural.

1.3.5 Dieta

Um dos fatores mais importantes relacionados com FL/P e FP é a dieta de mulheres grávidas pela sua influência direta no crescimento fetal (KAWALEC et al., 2015). Vujkovic et al. (2007) mostraram em um estudo caso-controle de 203 mães de crianças com FL/P que a

dieta materna rica em carne, frituras e massas, e pobre em frutas e legumes aumentou em, aproximadamente, duas vezes o risco de terem crianças afetadas.

A presença de diabetes e obesidade materna durante a gestação também parece estar associada com um maior risco de ter um filho com FL/P e FP não-sindrômica, porém é importante ressaltar que o efeito da obesidade poderia não ser um fator direto, mas secundário a interagir com outros fatores (SPILSON; KIM; CHUNG, 2001; CEDERGREN; KALLÉN, 2005; KAPPEN, 2013).

Kraples e colaboradores (2004) em um estudo feito com 182 mães de crianças com FL/P em comparação com 173 mães de crianças sem fissuras como caso-controle demonstraram que a dieta antes da gravidez pela ingestão de todos os macronutrientes, vitaminas e minerais foram menores em mães de crianças com FL/P e FP em comparação com controles, além de ter demonstrado a diferença de ingestão de proteína vegetal, fibra, β -caroteno, ácido ascórbico, ferro e magnésio. Esses resultados sugerem que a ingestão elevada de nutrientes, predominantemente, presente em frutas e vegetais reduz o risco destes defeitos congênitos.

Estudos epidemiológicos vêm fornecendo evidências de que a associação do consumo de 4 mg de ácido fólico/dia e o uso de multivitaminas contendo ácido fólico no período peri concepcional de uma mulher reduz o risco de muitas doenças congênitas (SHAW et al., 1995; WILCOX et al., 2007). Com conclusões de alguns estudos sobre a associação entre o uso materno de suplementos contendo ácido fólico e um risco reduzido de defeitos congênitos indicam que os genes envolvidos no metabolismo de ácido fólico e da metionina podem estar relacionados com a patogênese de fendas orofaciais (WERLER; LOUIK; MITCHELL, 1999).

Desta forma, dietas contendo frutas, verduras e legumes são necessárias pelo fato desses alimentos conter importantes agentes antioxidantes, tais como as vitaminas C, D, E e A, a clorofilina, os flavonóides, carotenóides, curcumina e outros, que são capazes de restringir a propagação das reações e das lesões induzidas pelos radicais livres. Podem atuar de diferentes formas, como por exemplo, impedindo a formação de radicais livres; impedindo o ataque sobre moléculas como lipídeos, aminoácidos, proteínas e DNA, evitando lesões e perda da integridade celular; reparando lesões já formadas; e remoção de danos na molécula de DNA (BARNETT; KING, 1995; FOTSIS et al., 1997; POOL-ZOBEL et al., 1997).

1.4 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a geração de moléculas instáveis e de elevada reatividade chamadas de radicais livres e o seu sistema de remoção, onde essas moléculas possuem como característica um único elétron não pareado na órbita externa do átomo. Exemplos de radicais livres são as espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) e as espécies reativas derivadas do nitrogênio (ERNs) (POLJSAK; MILISAV, 2012).

EROs incluem os radicais livres superóxidos e hidroxilas, bem como peróxido de hidrogênio que são moléculas não-radicaais e derivadas, principalmente, do oxigênio que é consumido em várias reações metabólicas que ocorrem principalmente na mitocôndria, peroxissomos e retículo endoplasmático (ER) (FINKEL, 2012; HANDY; LOSCALZO, 2012). São produzidos tanto por reações enzimáticas quanto por não enzimáticas. Reações catalisadas por enzimas que geram EROs incluem os que envolvem NADPH oxidase, xantina oxidase, incluindo óxido nítrico endotelial sintase (eNOS), ácido araquidônico e enzimas metabólicas, tais como as enzimas do citocromo P450, lipoxigenase e ciclo-oxigenase (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013).

A modulação dos níveis de EROs intracelular é crucial para a homeostase celular, porém quando há produção excessiva, esses produtos podem causar danos em componentes celulares, tais como DNA, proteínas e lipídios, levando a várias alterações metabólicas e inflamatórias (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; SENA; CHANDEL, 2012; GORRINI; HARRIS; MAK, 2013; VELLOSA et al., 2013).

Este desequilíbrio na produção e remoção dos radicais livres, promovido por uma variedade de agentes exógenos que induzem a produção de EROs ou por uma ineficiência na inativação pela ação das enzimas desintoxicantes e vitaminas, está fortemente associado com doenças multifatoriais incluindo aterosclerose, diabetes do tipo II, distúrbios neurológicos, doenças auto-imunes, envelhecimento e câncer (KESAEWALA; KRISHNA; MITCHELL, 2016).

Interessantemente, elevação dos níveis de estresse oxidativo durante a gravidez resulta em embriotoxicidade (DENNERY, 2007) e oxidação do DNA durante a embriogênese é um mecanismo pelo qual produtos químicos induzem efeitos teratogênicos (LIU; WELLS, 1995).

1.5 Vitamina D

1.5.1 Metabolismo da Vitamina D

A vitamina D é considerado um hormônio esteróide de grande importância por estar envolvido em processos fisiológicos fundamentais. Sua síntese encontra-se em maior parte na região cutânea (80-90%) apresentando-se na forma colecalciferol (ou vitamina D₃) a partir do precursor 7-deidrocolesterol após estimulação da luz solar; e em menor parte (10-20%) adquiridos a partir da dieta na forma de ergocalciferol (ou vitamina D₂). Ambas as formas sofrem o mesmo processo de metabolização até a forma ativa 1,25(OH)₂D₃ (PREMAOR; FURLANETTO, 2006; WAGNER; TAYLOR; HOLLIS, 2008).

O processo de síntese endógena das moléculas do grupo vitamina D na forma colecalciferol inicia nas camadas profundas da epiderme e para que esse processo ocorra, é preciso que o indivíduo receba a luz solar direta, especificamente a radiação ultravioleta B (UVB) nos comprimentos de onda entre 290 e 315 nanômetros (WEBB; KLINE; HOLICK, 1988).

Na bicamada lipídica dessas células está armazenada a substância precursora, o 7-deidrocolesterol (7-DHC), onde pela reação de fotólise a enzima 7-deidrocolesterol-redutase converte o 7-DHC em pré-vitamina D₃, que se apresenta como uma substância termoinstável. Esta molécula sofre uma reação de isomerização induzida pelo calor, assumindo uma configuração espacial mais estável, a vitamina D₃, sendo posteriormente secretada para o espaço extracelular e atingindo a corrente sanguínea (MORRIS, 1999; ARMAS; HOLLIS; HEANEY, 2004).

Ambas as formas de vitamina D (vitamina D₂ e D₃) continuam na forma inativa e são transportadas no sangue por uma glicoproteína, a proteína ligadora da vitamina D (DBP), sendo levadas até o fígado, onde passam por várias reações enzimáticas até atingirem a forma biologicamente ativa. Ao alcançarem o fígado, sofrem hidroxilação no carbono 25, mediada pela enzima microsomal CYP2R1, dando origem a 25-hidroxivitamina D ou 25(OH)D (BLOMBERG et al., 2010). A 25(OH)D se liga à DBP e é transportada a vários tecidos com células que contêm a enzima 1- α -hidroxilase que promove hidroxilação no carbono 1 da 25(OH)D, formando a 1- α ,25-diidroxi-vitamina D (1,25(OH)₂D), sendo esta a molécula metabolicamente ativa (NORMAN, 2008).

Os efeitos biológicos da 1,25(OH)₂D são mediados pelo receptor de vitamina D (VDR), um fator de transcrição que pertence à família de receptores hormonais nucleares. O VDR

humano tem peso molecular de 50 kDa e 427 resíduos de aminoácidos e possui uma porção hidrofóbica que liga-se a 1,25(OH)₂D e um domínio com dois dedos de zinco para ligação ao DNA, onde este receptor é encontrado em muitos tecidos, incluindo a placenta (BAKER et al 1988; ROCHELL et al., 2000; BOUILLON et al., 2008).

Assim, as principais funções da vitamina D estão relacionadas ao metabolismo do cálcio e desenvolvimento dos ossos, como também um papel importante em vários outros sistemas fisiológicos. A vitamina D foi sugerida em estimular a secreção de insulina e diminuir a resistência à insulina, incluindo efeitos anti-proliferativos e anti-inflamatórios (LAMBERG-ALLARDT; BRUSTAD; MEYER, 2013; FELDMAN et al. 2014; WIMALAWANSA, 2016).

Segundo Bouillon e colaboradores (2006) a 1,25(OH)₂D parece interferir de forma direta ou indireta em vários genes envolvidos na regulação do ciclo celular, diferenciação, apoptose e angiogênese, podendo atuar na diminuição da proliferação tanto de células normais e quanto neoplásicas.

A insuficiência de vitamina D está associada a complicações da gravidez incluindo pré-eclâmpsia, diabetes mellitus gestacional e nascimento prematuro, sugerindo também um papel importante para a vitamina D na manutenção da gravidez e desenvolvimento fetal (BODNAR et al., 2007; BODNAR; KROHN; SIMHAN, 2009; BAKER et al, 2010; PEREZ-FERRE et al., 2012, SABLOK et al., 2015).

Segundo Shin et al. (2010) a vitamina D parece ser importante na implantação do embrião no útero, ossificação do esqueleto fetal, como também impede que o corpo da gestante rejeite o feto que está sendo desenvolvido por impedir a produção de componentes que participam do processo de aborto.

Hart et al. (2015) realizaram um estudo sobre a deficiência de vitamina D na gestação e seus efeitos no feto ao longo da vida e encontraram que 36% dessas gestantes estavam com baixas concentrações da vitamina no período gestacional e forte associação no mal desenvolvimento pulmonar, cerebral e ósseo do feto.

A vitamina D parece ser importante para manutenção de uma gestação saudável. Um estudo com tecido placentário de partos prematuros, mostrou redução na expressão de VDR, indicando uma possível dependência da modulação da expressão do VDR para manutenção da gestação (FISCHER et al., 2007).

Desta forma, pelo fato do VDR ser crucial para as ações da vitamina D no organismo, alterações no receptor podem ter potencial de acarretar desequilíbrios fisiológicos e contribuir para o surgimento de vários processos patológicos (CHEN et al., 2014).

1.5.2 Importância da Vitamina D como antioxidante

Além das funções relatadas acima, tem sido descrita a capacidade da vitamina D de atuar como um antioxidante e anti-envelhecimento. Esta relação foi evidenciada por Kallary e colaboradores (2001) onde em estudo realizado em camundongos, através do teste de knockout, relacionaram o dano do DNA em células do epitélio do colón intestinal com a ausência de VDR nessas células. Corroborando com esse resultado Fedirko e colaboradores (2010) fizeram um estudo com 92 pacientes com adenoma no colón retal, onde esses pacientes receberam doses diárias de vitamina D e foi observado redução significativa de danos oxidativos no DNA no epitélio do colón.

Em 2014, Zhong e colaboradores demonstraram que células endoteliais quando estimuladas com vitamina D aumentaram o tempo de expressão do VDR e sua capacidade de se ligar a 1,25(OH)2D3, o que induziu positivamente a regulação necessária na proliferação celular como também na expressão da enzima antioxidante CuZn-superóxido dismutase (CuZn-SOD). Por outro lado, nas células endoteliais sem estímulo pela vitamina D ocorria processo de estresse oxidativo e o VDR deixou de ser expresso ou foi expresso defeituosamente, enfatizando que níveis suficientes de vitamina D e expressão adequada de VDR são fundamentais para manutenção da defesa à agentes oxidantes.

Halicka e colaboradores (2012) evidenciaram em uma pesquisa feita *in vitro*, com células de linhagem linfocítica e células de carcinoma pulmonar, uma redução de 50-70% dos níveis de oxidantes endógenos quando foram expostas a vitamina D na sua forma ativa (1,25(OH)2D), como também observaram uma atenuação em danos consecutivos ao DNA causados por esses produtos de oxidação celular.

O tratamento de várias linhagens celulares com 1,25(OH)2D mostrou levar à indução de importantes enzimas envolvidas na proteção ao estresse oxidativo, tais como tiorredoxina redutase 1 (TXNRD1) e superóxido dismutase (SOD) limitando o estresse oxidativo intracelular (SCHUTZE et al., 1999; PALMER et al., 2003; LAMBERT et al., 2006).

1.6 Definição de Polimorfismo Genético

O polimorfismo genético é a variação genética na sequência de alelos, de bases nucleotídicas ou na estrutura cromossômica. O tipo de polimorfismo mais estudado na literatura é o de base única, conhecido como SNP, do inglês *Single Nucleotide Polimorphism* (Polimorfismo de Nucleotídeo Único). Esse consiste em uma variação de um único nucleotídeo

em um local específico do genoma (STRACHAN, 2002; PARMIGIANI; CAMARGO, 2004; TAYLOR; PRESHAW; DONALDSON, 2004).

A presença de um polimorfismo pode implicar em mudança no código genético e a sequência da proteína correspondente, levando por consequência em alterações no genótipo (sequência de bases), afetando ou não o fenótipo, que, conseqüentemente determinará a função proteica (LEWIN, 2001).

1.7 O gene do Receptor da Vitamina D (*VDR*) e polimorfismos

O gene do receptor da vitamina D (*VDR*) (Fig. 4) está localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q13.11) e consiste em 9 éxons distribuídos entre as regiões 5' promotora e 3' reguladora (3-UTR), onde os éxons de 2 ao 9 codificam o produto final, enquanto o éxon 1, que é subdividido em 1a, 1b, 1c, 1d, 1e e 1f, tem funções regulatórias. O domínio de ligação de DNA é codificado pela região localizada entre os éxons 2 e 3. Os éxons 7, 8 e 9 codificam o domínio de ligação para 1,25-(OH)2D3 (MIYAMOTO et al, 1997).

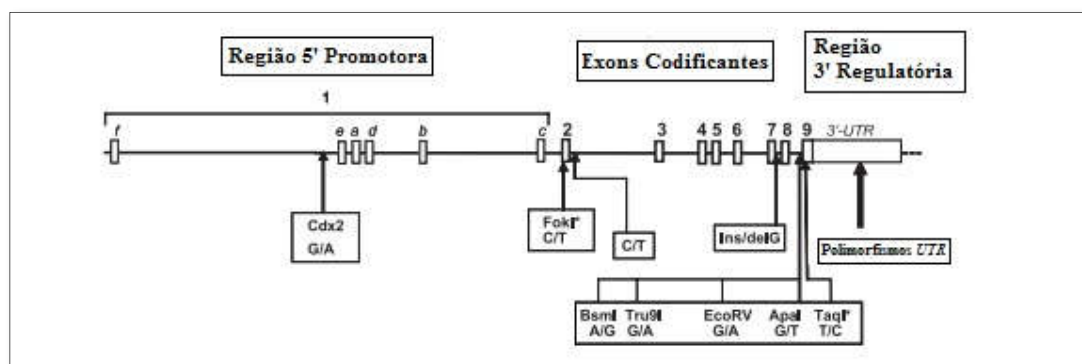


Fig. 4. Estrutura do gene *VDR* e localização dos principais polimorfismos. (Fonte: Adaptado de UITTERLINDEN et al., 2004)

Mais de 470 polimorfismos foram identificados no gene *VDR* humano, e sua importância funcional e efeitos potenciais na associação à doenças como câncer e diabetes, e à uma série de distúrbios neuropsiquiátricos, apresentando grande importância médica, como o rs2228570 (*FokI*), rs1544410 (*BsmI*), rs731236 (*TaqI*) e o rs7975232 (*ApaI*) (ZMUDA et al., 2000; OGUNKOLADE et al., 2002; EYLES et al., 2013). Estes polimorfismos estão distribuídos por toda a região do gene *VDR*: na região 5' promotora, nos éxons codificantes, na região dos íntrons e na região 3' regulatória (ARAI et al., 1997).

O polimorfismo rs2228570 resulta da substituição timina-citosina (T-C) na junção do íntron 1 com o éxon 2, na posição 30920, localizado no primeiro códon de iniciação da tradução, que traz como consequência uma proteína produzida com 3 aminoácidos a menos (ARAI et al., 1997; GROSS et al, 1997). Este apresenta dois códons de iniciação ATG separados por seis nucleotídeos no *f*-VDR, e faz com que o VDR seja produzido de forma completa com 427 aminoácidos, ou apenas um códon de iniciação devido a uma substituição T-para-C em 5' ATG, resultando numa proteína *F*-VDR curta (424 aminoácidos). Essa modificação estrutural poderia ocasionar maior funcionalidade do receptor da vitamina D em pessoas que apresentam o alelo F (ARAI et al., 1997; NEJENTSEV et al., 2004; VAN ETTEN et al., 2007).

Aslani et al. (2011) estudaram o polimorfismo rs2228570 em gestantes e descreveram que o alelo F parece estar relacionado a menor risco de diabetes gestacional. Complementando, foi mostrado que este mesmo alelo promove risco maternal ao parto prematuro (MANZON et al., 2014). Em contrapartida, outro estudo mostrou que mães com o alelo F pode proteger o feto contra os efeitos tóxicos do chumbo (KAYA-AKYUZLU et al., 2015).

O alelo *f* mostrou ser menos eficiente em ativações mediada pela vitamina D quando comparado ao alelo F em mulheres na fase da menopausa (MIYAMOTO et al., 1996). E em doenças como o câncer, o alelo F foi identificado como fator de risco para câncer ovariano (MOHAPATRA et al., 2013; XU et al., 2013), câncer de próstata (XU et al., 2007) e o alelo *f* já apresentou relação com risco aumentado em câncer de mama (ALIMIRAH et al., 2011).

O polimorfismo rs1544410 está localizado no íntron 8, posição 63980, e resulta na troca do nucleotídeo adenina para uma guanina (A-G). Por localizar-se em região não-codificante do gene, este polimorfismo não causa alteração na sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica sintetizada, porém ainda não se sabe seu exato efeito sobre a ativação do receptor da vitamina D (MORRISON et al. 1992; UITTERLINDEN et al., 2004; SLATTERY, 2007).

Sobre estudos relacionados a gestação, o genótipo BB foi evidenciado como potencial de risco para que gestantes tenham fraturas (FEUZ et al, 2009), porém não foi encontrada associação com quadros hipertensivos na gestação (REZENDE et al., 2012).

Estudos com esse polimorfismo também já foram realizados em relação a cânceres, como o alelo *b* ser um potencial alelo de risco para câncer de próstata (XU et al., 2007), para carcinoma de células renais (ARJUMAND et al., 2012) e câncer no colón retal (LACZMANSKA et al., 2014) e o alelo B como risco para câncer de mama (LI et al., 2014).

Contudo, apesar de haver evidências que mostram que a deficiência de vitamina D na gestação implica em complicações na gravidez e no desenvolvimento do feto, não há estudos analisando uma possível relação de polimorfismos do gene *VDR* para o desenvolvimento de

FL/P e FP, ressaltando a importância do presente estudo, cujo objetivo principal foi analisar a relação dos polimorfismos rs2228570 e rs1544410 do gene *VDR* como fator de risco para o desenvolvimento deste defeito congênito.

2. OBJETIVO

Determinar as associações de SNPs rs2228570 e rs1544410 do gene do receptor da vitamina D (*VDR*) com a suscetibilidade para o desenvolvimento de FL/P em genitoras e crianças com FL/P e FP.

2.1 Objetivos Específicos

1. Determinar a associação dos fatores de risco (idade materna, histórico familiar, condições ocupacionais, tabagismo, álcool, suplementação de ácido fólico e sulfato ferroso, uso de drogas e medicamento) no desenvolvimento de FL/P e FP na população estudada;
2. Determinar as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo rs2228570 e suas associações com o desenvolvimento de FL/P e FP;
3. Determinar as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo rs1544410 e suas associações com o desenvolvimento de FL/P e FP.

3. METODOLOGIA

3.1 População e Amostra

Foram incluídos no projeto 127 duplas (mãe e criança fissurada), que tenham procurado o Serviço de Fissurados do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba. Foram obedecidos os seguintes critérios de inclusão: 1) ser genitora de portador de fenda labial e/ou palatina independente de já ter sido submetido a cirurgia de correção; 2) pertencer a família que concordar em participar da pesquisa através de anuência expressa em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os resultados foram apresentados por tipo de fendas labiopalatinas, dividindo-as em dois grupos, o primeiro com 74 duplas FL/P (sendo 22 FL e 52 FLP) e o segundo grupo com 53 duplas com FP.

Foram incluídos também 82 duplas saudáveis (mães e criança saudável) que tenham procurado o serviço do Hospital Maternidade Cândida Vargas para amostra controle.

1.8 Aspectos Éticos

O presente projeto foi submetido à análise da Comissão de Ética para Pesquisas (CEP) em Humanos da Universidade Federal da Paraíba, situada no Campus I, no Hospital Universitário Lauro Wanderley, tem sido aprovado com o parecer de número 1.309.490 no dia 05 de novembro de 2015 (ANEXO A), onde o mesmo, posteriormente, sofreu alterações precisando ser reencaminhado ao CEP para nova aprovação para adição de novas amostras no trabalho e sendo aprovado no dia 13 de dezembro de 2016 com o parecer 1.865.600 (ANEXO B).

A inclusão dos pacientes na pesquisa aconteceu mediante convite prévio formalizado pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICES I e II).

O sigilo e o anonimato dos participantes foram mantidos em todas as etapas do trabalho. A entrevista aconteceu em espaço reservado e as informações contidas no formulário foram de uso exclusivo para a coleta de dados. Todos os trabalhos laboratoriais foram conduzidos através do uso de códigos de identificação preservando assim a identidade dos sujeitos de pesquisa.

3.3 Análise Molecular

3.3.1 Coleta das Amostras

As amostras de células bucais foram coletadas através de um bochecho, por 60 s, de 5 ml de solução de sacarose a 3%. O conteúdo resultante do bochecho foi transferido para um tubo de 15 ml, contendo previamente o volume de 5 ml de uma solução 66% alcoólica contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl e 7mM EDTA. No caso de crianças menores de 2 anos, incapazes de realizar bochecho, a coleta foi realizada com gaze estéril que foi posteriormente lavada na mesma solução 66% alcoólica contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl e 7mM EDTA. O material foi coletado em tubos de 15 ml do tipo *falcon* estéreis e livres de DNases e RNAases e em seguida levadas ao Laboratório de Estudos Moleculares e Análises Clínicas do Departamento de Biologia Molecular da UFPB.

3.3.2 Isolamento do DNA

A cada tubo foi adicionada água destilada e deionizada autoclavada q.s.p. 15 ml. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado em solução aquosa, contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl e 7 mM EDTA. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2 µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 50°C em movimento contínuo semicircular. Após 12 h de incubação, foi adicionado 500 µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 12.000 g a 4°C e 900 µl do sobrenadante foi transferido para novo tubo onde foi realizada precipitação do DNA com 540 µl de isopropanol. O precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, centrifugado (12.000 g por 5min), seco e ressuspenso em tampão Tris-EDTA (TE Buffer) (AIDAR; LINE, 2007).

3.3.3 Análise do polimorfismo VDR rs2228570

Os genótipos foram determinados por PCR-RFLP. Foram utilizados os iniciadores: 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3' (sense) e 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3' (antisense) (HUANG et al., 2002). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos,

35 ciclos de desnaturação (30 segundos à 94°C), anelamento (30 segundos à 58°C) e extensão (30 segundos à 72°C) com uma etapa extra de extensão final de 10 minutos. O produto de 265 pb foi digerido com *FokI* que reconhece e cliva o alelo polimórfico f gerando dois fragmentos (196 pb e outro de 69 pb) enquanto o alelo ancestral F permanece com 265 pb. Os genótipos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com nitrato de prata 0,5%. Na figura 5A são mostrados os genótipos de algumas amostras aplicadas em gel de eletroforese, onde na coluna 2 se encontra o padrão de peso molecular de 50pb, nas colunas 4, 7 e 8 são amostras de genótipo FF, nas colunas 1, 3 e 5 o genótipo Ff e na coluna 6 o genótipo ff.

3.3.4 Análise do polimorfismo VDR rs1544410

Os genótipos foram determinados por PCR-RFLP. Foram utilizados os iniciadores: 5'CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' (sense) e 5'-AACCAGCGGGAA GTCAAGGG-3' (antisense) (PANI et al., 2000) e a amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação (1 minuto à 94°C), anelamento (1 minuto à 58°C) e extensão (3 minutos à 72°C) com uma etapa extra de extensão final de 5 minutos. O produto de 825 pb foi digerido com *BsmI* que reconhece e cliva o alelo polimórfico b gerando dois fragmentos (650 pb e 175 pb) enquanto o alelo ancestral B permanece com 825 pb. Os genótipos foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e coloração com nitrato de prata 0,5%. Na figura 5B são mostrados os genótipos de algumas amostras aplicadas em gel de eletroforese, onde na coluna 5 se encontra o padrão de peso molecular de 100pb, nas colunas 3, 4 e 9 são amostras de genótipo BB, nas colunas 6 e 8 o genótipo Bb e nas colunas 1, 2 e 7 o genótipo bb.

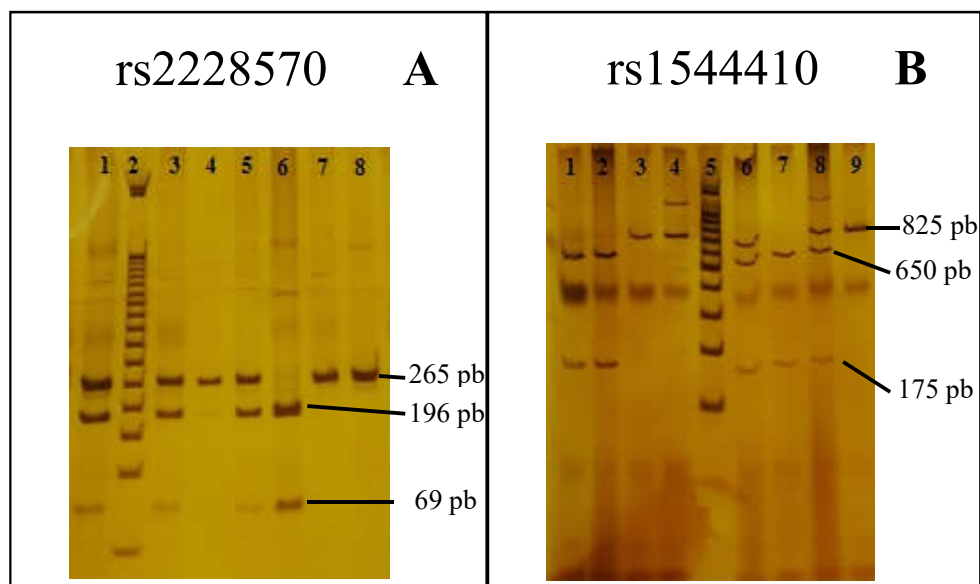


Fig. 5. Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata da genotipagem de amostras para rs2228570 (A) e rs1544410 (B)

3.4 Avaliação de fatores de risco ambientais durante o período gestacional

Para coleta de dados clínicos, foram utilizados literatura científica relacionada como critérios para elaboração dos questionários. A partir da análise, foram identificados os principais fatores relacionados e a forma de apresentá-los (DAI et al., 2010; JOHNSON et al., 2009; FORRESTER; MERZ, 2004; DEROO; GAUDINO; EDMONDS, 2003), que levou a construção do INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS (APÊNDICE III).

3.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do teste qui-quadrado.

Para todos os testes foi considerado como nível de significância o $p < 0,05$. O programa escolhido para a utilização dos testes citados foi o GraphPad.Instat, versão 3.0 (San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

Na tabela 1 encontram-se os resultados dos fatores ambientais do grupo controle (GC), grupo FL/P (GL/P) e grupo FP (GP) e a diferença da idade média apresentou significância entre GC e GP, com $p = 0,017$, porém não apresentou quando comparado GC com GL/P.

Tabela 1. Frequência dos fatores ambientais do grupo controle (GC), grupo de fissuras labiais e labiopalatinas (GL/P) e grupo de fissuras palatinas (GP)

		GC	GL/P	GP	p	
Idade média das mães	<i>Méd. - SD</i>	25,7-6,04	27,3-6,51	28,6-6,06	*0,187 [‡] *0,017 [‡]	
Histórico Familiar	n (%)	05 (6%)	39 (52,7%)	22 (41,5%)	<0,0001 [‡] <0,0001 [‡]	
Condições Ocupacionais	Lavradora	n (%)	06 (7,3%)	13 (17,5%)	09 (17%)	0,087 [‡] 0,143 [‡]
	Do lar	n (%)	28 (34,1%)	30 (40,5%)	15 (28,3%)	0,509 [‡] 0,601 [‡]
	Ativo	n (%)	02 (2,4%)	04 (5,4%)	02 (3,7%)	0,585 [‡] 0,655 [‡]
Tabagismo	Passivo	n (%)	16 (19,5%)	20 (27%)	11 (20,7%)	0,356 [‡] 0,860 [‡]
	Ativo/ Passivo	n (%)	02 (2,4%)	05 (6,7%)	06 (11,3%)	0,361 [‡] 0,078 [‡]
Álcool	n (%)	09 (11%)	17 (23%)	12 (22,6%)	0,073 [‡] 0,113 [‡]	
Suplementação - Sulfato ferroso e ácido fólico	n (%)	70 (85,3%)	55 (74,3%)	45 (84,9%)	0,127 [‡] 0,941 [‡]	

Fonte: Dados da pesquisa, 2017. *Teste t não pareado. Teste qui-quadrado. $p < 0,05$ = diferença significativa. GC: Grupo Controle. GL/P: Grupo de Fissuras Labiais e Labiopalatinas. GP: Grupo de Fissuras Palatinas Isoladas. [‡]Teste feito entre GC e GL/P. [‡]Teste feito entre GC e GP.

Quando comparado a porcentagem de filhos fissurados apresentaram ter histórico familiar de fissuras foi expressivamente maior ao que foi relatado no grupo controle, onde o grupo controle apresentou 6% de histórico familiar, GL/P apresentou 52,7% ($p < 0,0001$) e GP apresentou 41,5% ($p < 0,0001$). Podemos perceber também que em GL/P a quantidade de mães fumantes passivas (27%) foi expressivamente maior que em GC e GP (19,5% e 20,7%, respectivamente), assim como também em fumante ativa, onde em GL/P foi de 5,4%, GC foi de 2,4% e GP foi de 3,7%. Já em fumantes tanto ativas quanto passivas GP apresentou frequência maior (11,3%), enquanto que GL/P foi de 6,7% e GC 2,4%.

Sobre o uso de suplementação de Ácido Fólico e Sulfato Ferroso a frequência foi aproximada entre os grupos GC (85,3%) e GP (84,9%), enquanto que GL/P apresentou frequência menor de 74,3%, mas não houve diferença significativa entre os grupos. Sobre o uso de álcool, em mães de GC, 11% relataram fazer uso de bebidas alcoólicas enquanto que GL/P foi de 23% e GP 22,6%, tendo valores maiores que o grupo controle, porém não apresentaram diferença significativa. Quanto a frequência de mães que trabalham como lavradoras, o GC apresentou frequência de 7,3%, GL/P de 17,5% e GP de 17%, mostrando uma diferença não significativa. Nenhuma das mães tanto dos grupos testes quanto do grupo controle relataram o uso de drogas ilícitas e medicamentos de risco para o desenvolvimento de fissuras antes ou durante a gestação.

Os resultados das distribuições genotípicas encontradas nos grupos estudados estão de acordo com o equilíbrio Hardy-Weinberg (tabelas 2), onde todos os genótipos apresentaram valor de $p < 0,05$.

Tabela 2. Resultado do Equilíbrio Hardy-Weinberg para as distribuições genótípicas de rs2228570 e rs1544410 nos grupos estudados

rs2228570				
Grupos estudados	FF	Ff	ff	p
<i>GC</i>	34	40	08	0,443
<i>GL/P</i>	39	28	07	0,551
<i>GP</i>	31	17	05	0,258
<i>CC</i>	42	35	05	0,515
<i>CL/P</i>	39	26	09	0,171
<i>CP</i>	30	16	07	0,062

rs1544410				
Grupos estudados	BB	Bb	bb	p
<i>GC</i>	23	44	15	0,449
<i>GL/P</i>	24	31	19	0,173
<i>GP</i>	11	23	19	0,415
<i>CC</i>	23	36	23	0,269
<i>CL/P</i>	21	31	22	0,163
<i>CP</i>	05	25	23	0,628

Fonte: Dados da pesquisa, 2017. GC: Genitoras Controle. GL/P: Genitoras do grupo de Fissuras Labiais e Labiopalatinas. GP: Genitoras do grupo de Fissuras Palatinas Isoladas. CC: Crianças Controle. CL/P: Crianças do grupo de Fissuras Labiais e Labiopalatinas. CP: Crianças do grupo de Fissuras Palatinas Isoladas.

A distribuição genotípica e frequência alélica de rs2228570 tanto no grupo de genitoras quanto de afetados não foi diferente do GC (tabelas 3 e 4). Não houve diferença significativa na distribuição genotípica e frequências alélicas em nenhum dos grupos analisados quando comparado aos grupos controle.

Tabela 3. Análise dos genótipos rs2228570 em genitoras.

rs2228570	GC	GL/P	GP	p
FF	41,5% (34)	52,7% (39)	58,5% (31)	
Ff	48,7% (40)	37,8% (28)	32% (17)	
ff	9,8% (8)	9,5% (7)	9,5% (5)	
FF x Ff+ff	34 x 40+8	39 x 28+7	31 x 17+5	0,213 [‡] 0,078 [‡]
ff x Ff+FF	8 x 40+34	7 x 28+39	5 x 17+31	0,950 [‡] 0,950 [‡]
%F	65,8% (108)	71,6% (106)	74,5% (79)	0,377 [‡]
%f	34,2% (56)	28,4% (43)	25,5% (27)	0,169 [‡]

Fonte: Dados da pesquisa, 2017. Teste qui-quadrado. GC: Genitoras Controle. GL/P: Genitoras do grupo de Fissuras Labiais e Labiopalatinas. GP: Genitoras do grupo de Fissuras Palatinas Isoladas. [‡]Teste feito entre GC e GL/P. [‡]Teste feito entre GC e GP.

Tabela 4. Análise dos genótipos rs2228570 em crianças.

rs2228570	CC	CL/P	CP	p
FF	51,2% (42)	52,7% (39)	56,6% (30)	
Ff	42,6% (35)	35,1% (26)	30,1% (16)	
ff	6,2% (5)	12,2% (9)	13,3% (7)	
FF x Ff+ff	42 x 35+5	39 x 26+9	30 x 16+7	0,980 [‡] 0,663 [‡]
ff x Ff+FF	5 x 35+42	9 x 26+39	7 x 16+30	0,297 [‡] 0,267 [‡]
%F	72,5% (119)	70,2% (104)	71,7% (76)	0,747 [‡]
%f	27,5% (45)	29,8% (44)	28,3% (30)	0,987 [‡]

Fonte: Dados da pesquisa, 2017. Teste qui-quadrado. CC: Crianças Controle. CL/P: Crianças do grupo de Fissuras Labiais e Labiopalatinas. GP: Crianças do grupo de Fissuras Palatinas Isoladas. [‡]Teste feito entre CC e CL/P. [‡]Teste feito entre CC e CP.

A distribuição genotípica e frequência alélica de rs1544410 em genitoras estão apresentados na tabela 5. Não houve diferença na frequência alélica e genotípica para o rs1544410. Não houve diferença significativa na distribuição genotípica e frequências alélicas em nenhum dos grupos de genitoras quando comparado ao grupo controle.

Tabela 5. Análise dos genótipos rs1544410 em genitoras.

rs1544410	GC	GL/P	GP	p
BB	28% (23)	32,4% (24)	20,7% (11)	
Bb	53,6% (44)	42% (31)	43,3% (23)	
bb	18,4% (15)	25,6% (19)	36% (19)	
BB x Bb+bb	23 x 44+15	24 x 31+19	19 x 23+11	0,673 [‡] 0,443 [†]
bb x Bb+BB	15 x 44+23	19 x 31+24	11 x 23+19	0,357 [‡] 0,896 [†]
%B	54,9% (90)	53,3% (79)	42,4% (45)	0,879 [‡]
%b	45,1% (74)	46,7% (69)	57,6% (61)	0,061 [†]

Fonte: Dados da pesquisa, 2017. Teste qui-quadrado. GC: Genitoras Controle. GL/P: Genitoras do grupo de Fissuras Labiais e Labiopalatinas. GP: Genitoras do grupo de Fissuras Palatinas Isoladas [‡]Teste feito entre GC e GL/P. [†]Teste feito entre GC e GP.

A distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo rs1544410 em crianças estão mostrados na tabela 6. Houve diferença alélica e genotípica do rs1544410 ao cruzar CC com CP. Quando comparado as distribuições genotípicas de CP com CC houve diferença significativa com $p = 0,017$. Quando comparado as frequências alélicas de CP com CC apresentou $p = 0,008$. Em relação as frequências alélicas, quando comparado os alelos de CP com CC houve diferença significativa, com $p = 0,008$, onde a frequência do alelo B em CP foi de 33% e do alelo b foi de 71%, para CC a frequência dos alelos B e b foram de 50% e para o grupo CL/P o alelo B apresentou frequência de 49,3% e o alelo b de 50,7%.

Tabela 6. Análise dos genótipos rs1544410 em crianças.

rs1544410	CC	CL/P	CP	p
BB	28% (23)	28,3% (21)	9,4% (5)	
Bb	44% (36)	42% (31)	47,1% (25)	
bb	28% (23)	29,7% (22)	43,5% (23)	
BB x Bb+bb	23 x 36+23	21 x 31+22	5 x 25+23	0,936 [‡] 0,017[†]
bb x Bb+BB	23 x 36+23	22 x 31+21	23 x 25+5	0,956 [‡] 0,098 [†]
%B	50% (82)	49,3% (73)	33% (35)	0,995 [‡]
%b	50% (82)	50,7% (75)	67% (71)	0,008[†]

Fonte: Dados da pesquisa, 2017. Teste qui-quadrado. $p < 0,05$ = diferença significativa. CC: Crianças Controle. CL/P: Crianças do grupo de Fissuras Labiais e Labiopalatinas. GP: Crianças do grupo de Fissuras Palatinas Isoladas. [‡]Teste feito entre CC e CL/P. [†]Teste feito entre CC e CP.

5. DISCUSSÃO

Apesar dos valores próximos da média de idades entre os grupos, os resultados do presente estudo mostraram significância, evidenciando uma possível relação da idade com o surgimento de FL/P e FP como já relatado na literatura (SHAW et al., 1998; DEROO; GAUDINO; EDMONDS, 2003; FORRESTER; MERZ, 2004; VALLINO-NAPOLI; RILEY; HALLIDAY, 2006; DAI et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2015; WANG et al., 2016).

Sobre a suplementação de ácido fólico e sulfato ferroso, a alta frequência entre os grupos era esperada pelo fato de que o uso dessas duas suplementações já serem preconizadas e de rotina na condução do pré-natal, sendo nutrientes importantes tanto para a redução de anemias nas gestantes, quanto para o crescimento do feto (FUJIMORI et al., 2000; FONSECA et al., 2003; SANTOS; PEREIRA, 2007). Além disso, desde 2004 o Ministério de Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária tornou obrigatório a fortificação de farinha de trigo e milho com ácido fólico e sulfato ferroso, onde para cada 100g de farinha de trigo e milho contém 4,2 mg de ferro e 150 mg de ácido fólico (BRASIL, 2017).

O consumo do folato foi investigado em parturientes cariocas, nas quais a prevalência de deficiência de ácido fólico na dieta foi de 51,3% e somente 22,4% das gestantes fizeram uso de suplemento medicamentoso contendo ácido fólico (FONSECA et al., 2003). Em outro estudo de proporção verificou-se que o consumo de folato durante a gravidez esteve abaixo da recomendação em pelo menos 75% das participantes (BARROS et al., 2004). Assim como Figueiredo et al. (2015) viu que baixo teor de folato e uso inadequado de folato durante o período periconcepcional e durante o primeiro trimestre de gravidez demonstraram correlação potencial com uma alta incidência de fissuras orofaciais.

No presente estudo não foram encontradas evidências da associação entre a exposição ativa ou passiva à fumaça do cigarro e a ocorrência de fissuradas na prole. Isso pode ser explicado pela pequena quantidade de mães que relataram ter feito uso de cigarro durante o período de gestação. Contrariando esses achados, Honein et al. (2007) mostraram a associação de exposição ao cigarro tanto de forma ativa quanto passiva em período periconcepcional e fissuras orofaciais. Chung et al. (2000) observaram que mães fumantes ativas tinham maior chances de ter filhos com fissuras labiais e/ou palatinas e quanto maior a frequência de uso do cigarro, maior se torna o risco. Assim como Little e colaboradores (2004) também observaram forte associação de mães fumantes ativas e alta taxa de casos de crianças que nasciam com esse defeito congênito.

Com foco apenas em mães fumantes passivas, Sabbagh e colaboradores (2015) puderam observar que a exposição materna ao tabagismo passivo resultou em um aumento de 1,5 vezes no risco de fissuras, porém semelhante à magnitude do risco relatado para o tabagismo ativo. Zhiwena e colaboradores (2010) viram que mães que tinham exposição 6 vezes por semana ao cigarro tinham mais chances de terem filhos com fissuras.

O histórico familiar apareceu como um importante fator de risco para fissuras na população estudada. Esses resultados corroboram com estudo realizado por Birnbaum et al. (2007), onde foi mostrado que pacientes com fissuras labiais com/ou sem palato não-sindrômico relataram ter histórico familiar de fissuras orofaciais, sendo fortemente sugestivo de herança genética dominante.

Há estudos que mostram que história familiar positiva relacionada à fissura aumentou o risco de ocorrência de fissura labiais com ou sem palato em recém-nascidos (ZARANTE et al., 2009; SALIHU et al., 2014). Leite e Koifman (2009), evidenciaram que história familiar de fissuras tanto pela família do pai quanto pela família da mãe está fortemente associada para prole nascer com FL/P. Natsume et al. (2000) encontraram em estudo de caso controle na população japonesa que 15,4% dos casos de FL/P tem histórico familiar enquanto que no grupo controle apresentavam apenas 1,6%.

Nosso estudo mostrou frequência maior de consumo de bebidas alcoólicas em mães dos grupos testes em relação ao grupo controle, apesar de não ter sido significativo. Lorente e colaboradores (2000) identificaram um risco aumentado de FP isolada, mas não de FL/P, entre as mães que bebiam durante o primeiro trimestre da gestação. Porém outro estudo encontrou que o uso de álcool durante a gravidez pode ser fator de risco para FL/P (MUNGER et al., 1996). Deroo e colaboradores (2016) encontraram forte associação do uso repetitivo e em altas quantidade do álcool no primeiro trimestre da gestação e o risco de FL e FP, porém não encontraram associação com os outros tipos de fissura. Outros estudos indicam que o risco de FL/P e FP tende a aumentar quando a gestante apresenta consumo frequente de álcool (DEROO et al., 2008; LEITE; KOIFMAN, 2009).

Estudos indicam que o momento da exposição ao álcool durante a gestação é importante para avaliar o efeito na ocorrência de fissuras no feto, onde sugere-se que, o período mais crítico seria no primeiro trimestre, mais precisamente entre a 5^a e 10^a, período onde as estruturas do lábio e palato embrionários estão sendo formados, porém os mecanismos ainda são desconhecidos (HOBBS et al., 2014; DEROO et al., 2016).

Pelo fato de embriologicamente as FL/P possuir diferença etiológica das FP, foi preciso separá-las em nosso estudo. A FL e FLP se formam diante da falta de fusão dos processos nasais

com o processo maxilar na sétima semana de gestação, enquanto que a FP é resultante da falta de fusão dos processos bilaterais independentes do maxilar por volta da décima segunda semana de vida intra-uterina (LOFFREDO et al., 1994; DUARTE; LEAL, 1999; MARAZITA; MOONEY, 2004; AFSHAR; BRUGMANN; HELMS, 2012).

Na comparação dos resultados das análises genótípicas dos grupos testes com os grupos controles para o polimorfismo rs2228570, não observamos associação deste polimorfismo como potencial de risco para o surgimento de FL/P e FP.

Por outro lado, o alelo F foi identificado como fator de risco para câncer ovariano (MOHAPATRA et al., 2013; XU et al., 2013), e à maior agressividade histopatológica de câncer de próstata (XU et al., 2007), o alelo f apresentou relação com risco e aumento da agressividade de câncer de mama, tendo em vista que atua na expressão de genes pró inflamatórios, tendo essas substâncias importante papel na progressão e metástase da doença (ALIMIRAH et al., 2011).

Sobre a temática de diabetes, o alelo F esteve associado ao risco de diabetes tipo 1 (GUJA et al., 2002; AUDI et al., 2004) e tipo 2 (WANG et al., 2012). Além disso, o alelo F está relacionado ao risco de desenvolvimento de doença renal crônica em diabetes tipo 2 (YOKOYAMA et al., 2012). Este mesmo alelo já foi associado como fator genético de risco para obesidade e síndrome metabólica (FILUS et al., 2008), o alelo f tem sido associado ao aumento de risco de desenvolvimento de hipertensão (LI et al., 2002; WANG et al., 2013). O alelo F parece estar relacionado a menor risco de diabetes gestacional (ASLANI et al., 2011). Manzon et al. (2014) mostraram que o alelo F promove risco maternal ao parto prematuro, tendo em vista que este genótipo pode resultar em um defeito na função da placenta e causar o nascimento precoce do feto e em outro estudo foi mostrado que mães com este alelo pode proteger o feto contra os efeitos tóxicos do chumbo quando mães gestantes estão expostas a ele (KAYA-AKYUZLU et al., 2015).

Sobre doenças autoimunes, o alelo f foi associado com risco aumentado para desenvolver doença de Hashimoto (INOUE et al., 2014), já o alelo F tem sido associado com a patogênese da doença autoimune artrite reumatoide, por mostrar relação em potencializar a proliferação de células do sistema imune encontradas nessa patologia (KARRAY et al., 2012). Porém em relação a doenças autoimunes da tireoide, não foi encontrado relação com este polimorfismo (FENG et al., 2013).

Na análise de rs1544410, o genótipo BB apareceu como protetor contra ocorrência FP mas não para FL/P e a presença do alelo b significou risco aumentado para a mesma condição. Como não existem estudos prévios a esse respeito, sugere-se que o mecanismo da relação possa

estar relacionado ao envolvimento do rs1544410 com estresse oxidativo e processo inflamatório.

O estresse oxidativo vem sendo associado com fissuras na literatura em estudos escassos. Hozyasz e colaboradores (2003) demonstraram um estado de estresse oxidativo sistêmico em mães de crianças com FL/PNS mesmo 6 meses após o nascimento da criança. Além disso, Hozyasz e colaboradores (2004) encontraram evidências que sugerem que o estresse oxidativo pode contribuir para defeitos de nascimento demonstrando que biomarcadores de lesão oxidativa do DNA são mais abundantes em mães que tiveram bebês com fissuras orofaciais em comparação com os controles.

Além disso, estudos encontraram uma associação de mães obesas com o aumento do risco de ter filho com FL, FLP ou FP (STOTHARD et al., 2009; BLOMBERG; KALLÉN, 2010; STOTT-MILLER et al., 2010). O excesso de adiposidade resulta em secreção aumentada de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, levando a infiltração de células imunes ao tecido e um estado crônico de inflamação (TRAYHURN; WOOD, 2004; DE FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008).

A relação entre o polimorfismo rs1544410 do *VDR* e variação no estresse oxidativo vem sendo descrito, onde em trabalho experimental realizado por Medeiros Cavalcante et al. (2015) observou-se que mulheres com genótipo BB e Bb quando combinado suplementação em altas doses de vitamina D apresentavam redução de marcadores inflamatórios e aumento da capacidade antioxidante total comparados àquelas que tinham genótipo bb.

O alelo b do rs1544410, identificado neste estudo como potencialmente relacionado com a ocorrência de FP, tem sido relacionado com outras condições clínicas que apresentam como característica comum o aumento de atividade inflamatória, como em doenças autoimunes, Nefrite relacionada ao Lupus em população japonesa (HUANG et al., 2002), e em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico com níveis aumentados de anticorpos antinucleares (KALETA et al., 2013) e obesidade associada ao aumento da atividade inflamatória (AL-DAGHRI et al., 2014). Contudo, não há consenso nessas associações e outros estudos apontam o alelo B como sendo o alelo risco para Lupus Eritematoso Sistêmico (ABBASI et al., 2010; AZAD et al., 2016), artrite reumatoide (GÓMEZ-VAQUERO et al., 2007; KARRAY et al., 2012) e doença autoimune da tireoide (FENG et al., 2013). Além disso, o mesmo alelo B já foi associado ao risco de desenvolver obesidade em mulheres Vietnamita (BINH et al., 2011), síndrome metabólica (FILUS et al., 2008) e como risco para desenvolver hipertensão (LI et al., 2002; WANG et al., 2013).

Com relação à diabetes, o alelo B deste polimorfismo esteve associado ao risco para diabetes do tipo 2 (WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2012), porém o alelo b foi descrito como associado com maior risco de retinopatia diabética em população coreana diabética (HONG et al., 2015).

Esse é o primeiro estudo a relacionar polimorfismos do gene *VDR* com fissuras labiopalatinas não-sindrômicas e os resultados sugerem que o polimorfismo rs1544410 está associado com o desenvolvimento de FP nas crianças, porém não foi encontrado resultados para este mesmo polimorfismo em crianças com FL/P como também no grupo de genitoras. Apesar dos resultados encontrados, é preciso que novas pesquisas sejam realizadas para confirmar a associação e identificar os mecanismos de participação de polimorfismos do *VDR* na ocorrência de fissuras labiopalatinas.

6. CONCLUSÃO

A idade média das mães foi maior em mães de crianças com FP em comparação ao grupo controle e ao grupo de mães de crianças com FL/P. O histórico familiar se mostrou como expressivo fator de risco para ambos os grupos (FL/P e FP). A ocupação de lavradora e do lar não mostrou ser fator de risco na população estudada, assim como o tabagismo (passivo e/ou ativo) e álcool. Ambos os grupos testes e controle mostrou alta porcentagem no uso de suplementação de ácido fólico e sulfato ferroso. E nenhuma das mães relatou ter feito uso de drogas e medicamentos de risco durante a gestação.

Ao determinar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs estudados do gene VDR, o polimorfismo rs2228570 não apresentou associação com o desenvolvimento de FL/P e FP nos grupos de genitoras e crianças afetadas. Em relação ao polimorfismo rs1544410, não apresentou associação para desenvolvimento de FL/P e FP no grupo de genitoras, porém como risco para o desenvolvimento de FP no grupo de crianças afetadas, mas não para FL/P, e os resultados deste estudo permitem sugerir que este polimorfismo pode estar envolvido no surgimento de FP, mas não para FL/P, sendo o alelo b de risco para esta condição. Estudos envolvendo maior número de indivíduos, abrangência geográfica e outras abordagens experimentais genéticas podem confirmar este dado.

7. ARTIGO

Submetido à revista *Birth Defects Research* no dia 14 de julho de 2017.

INFLUENCE OF rs2228570 AND rs1544410 VDR POLYMORPHISMS ON THE OCCURRENCE OF NONSYNDROMIC OROFACIAL CLEFTS

Vanessa de Melo Cavalcanti Dantas¹, Clara Soeiro Maas², Pâmella Kelly Farias de Aguiar³, Allane Maria Lacerda Ferreira de Oliveira³, Paulo Germano Cavalcante Furtado⁴, Lindalva Alves de Oliveira⁴, Darlene Camati Persuhn⁵

Author Affiliations

1 Master student Program in Molecular and Celular Biology - Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

2 Student of Biotechnology - Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

3 Graduate Program in Molecular and Celular Biology - Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

4 Lauro Wanderley Hospital - Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

5 Molecular Biology Departament - Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

Correspondence to

Darlene Camati Persuhn, Federal University of Paraíba Molecular, Cidade Universitária, Biology Departament/CCEN, 58059-900, João Pessoa, Paraíba State, Brazil. +55 83 3216-7642. E-mail: darlenecp@hotmail.com

Abstract

Background Nonsyndromic orofacial clefts have a very complex multifactorial etiology. Vitamin D insufficiency is associated with complications of gestation period, suggesting an important role for this nutrient in maintaining pregnancy and fetal development. The objective of this study was to investigate the relationship between the polymorphisms rs2228570 and rs1544410 of the VDR gene, which encodes the vitamin D cell receptor, with the occurrence of cleft lip with or without cleft palate (CL/P) and cleft palate only (CP). **Methods** A control case study was conducted with 52 CL/P, 22 CP and 82 healthy children and mothers. The children and mothers were genotyped for the rs2228570 and rs1544410 of the VDR gene. **Results** The allelic and genotypic distribution of rs2228570 was similar in the both children and mothers groups. The rs1544410 BB genotype ($p = 0.017$) was more frequent in the children control group and the b allele was significantly more present in the CP group ($p = 0.008$). In the mothers comparison no differences were found. **Conclusion** The results suggest that the rs1544410 polymorphism is associated with the development of CP. The BB genotype appeared as a protector against CP but not for CL/P, and the presence of the b allele in the child meant an increased risk for CP.

Key Words: Cleft lip and palate, VDR, Polymorphisms, Control Case Study, Oxidative Stress.

INTRODUCTION

Clefts can be classified based on affected structures, cleft lip (CL), cleft palate (CF) or the combination of both (cleft lip and palate or CLP), and may be syndromic clefts when they are associated with other congenital malformations, or nonsyndromic, when these clefts occur in isolation (Bhaskar; Murthy; Babu, 2011).

Vitamin D insufficiency is associated with complications of pregnancy including premature birth, poor lung, brain and fetal bone development, suggesting an important role for vitamin D in maintaining pregnancy and fetal development (Sablok et al., 2015).

The biological effects of the vitamin are mediated by its receptor VDR (vitamin D receptor), which is found in many tissues, including the placenta. Human VDR, belongs to the family of nuclear hormone receptors, has a hydrophobic portion that binds to 1,25(OH)₂D (active form of vitamin D) and a two-finger zinc domain for DNA binding (Bouillon et al., 2008).

The VDR gene is located on the long arm of chromosome 12 (12q13.11) and consists of 9 exons and more than 470 polymorphisms were identified in the human VDR gene (Uitterliden et al., 2004).

Because there is evidence that vitamin D has an important role in maintaining gestation and fetal development, this study aimed to find a possible relation between the polymorphisms rs2228570 and rs1544410 of the VDR gene with the appearance of CL/P and CP.

METHODS

The subjects were recruited at the Lauro Wanderley University Hospital of the Federal University of Paraíba between March 2012 and March 2017. Were included in the study 127 double of affected child and mothers that were grouped according to the cleft classification in FL / P 22 FL and 52 FLP) and FP (n = 53). The control group was recruited at the Cândida Vargas Maternidade Hospital, where 82 healthy couples (healthy mothers and children) were included.

The study was approved by the Ethics Committee for Human Research of the Federal University of Paraíba, located in Campus I, at the Lauro Wanderley University Hospital.

Genomic DNA was isolated from buccal mucosa cells obtained by mouthwash with a 3% sucrose solution and transferred to a tube with a 66% alcoholic solution containing 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl e 7mM EDTA (Aidar and Line, 2007).

Genotypes were determined by PCR-RFLP. For the polymorphism rs2228570 the primers were used: 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3' (sense) and 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3' (antisense) (Huang et al., 2002). Amplification occurred under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 10 minutes, 35 cycles of denaturation (30 seconds at 94 °C), annealing (30 seconds at 58 °C) and extension (30 seconds at 72 °C) with an extra 10 minute final extension step. The 265 bp product was digested with FokI which recognizes and cleaves the polymorphic allele f generating two fragments (196 bp and the other 69 bp) while the ancestral F allele remains at 265 bp.

For the polymorphism rs2228570 the primers were used: 5'CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' (sense) and 5'-AACCAGCGGGAA GTCAAGGG-3' (antisense) (Pani et al., 2000) and amplification occurred under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 minutes, 30 cycles of denaturation (1 minute at 94 °C), annealing (1 minute at 58 °C) and extension (3 minutes at 72 °C) with an extra 5 minute final extension step. The 825 bp product was digested with BsmI which recognizes and cleaves the polymorphic allele b generating two fragments (650 bp and the other 175 bp) while the ancestral B allele remains at 825 bp.

For both polymorphisms the genotypes were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis 8% and 0.5% silver nitrate staining.

Statistical analysis was performed using the chi-square test and $p < 0.05$ for all tests. The program chosen for the use of the cited tests was GraphPad.Instat, version 3.0.

RESULTS

The results of the genotypic distributions found in the groups studied are in Hardy-Weinberg Equilibrium (data not shown). The genotypic distribution and allele frequency of rs2228570, both mothers affected groups were not different from the control group (table 1).

The genotypic distribution and allelic frequency of rs1544410 in affected group and mothers group are shown in table 2. There was no difference in allelic and genotypic frequency for rs1544410 in the mother. However, there was an allele ($p = 0.008$) and genotype ($p = 0.017$) difference of rs1544410 in children when crossing children from the control group and children from the CP group, with the BB and B allele genotypes being more present in the control group than in the CP.

Table 1. Analysis of the rs2228570 genotypes in both mothers and children.

rs2224870				
	CM	ML/P	MP	p
FF	41,5% (34)	52,7% (39)	58,5% (31)	
Ff	48,7% (40)	37,8% (28)	32% (17)	
ff	9,8% (8)	9,5% (7)	9,5% (5)	
FF x Ff + ff	34 x 40+8	39 x 28+7	31 x 17+5	0,213 [‡] 0,078 [‡]
ff x Ff + FF	8 x 40+34	7 x 28+39	5 x 17+31	0,950 [‡] 0,950 [‡]
%F	65,8% (108)	71,6% (106)	74,5% (79)	0,377 [‡]
%f	34,2% (56)	28,4% (43)	25,5% (27)	0,169 [‡]
	CC	CL/P	CP	p
FF	51,2% (42)	52,7% (39)	56,6% (30)	
Ff	42,6% (35)	35,1% (26)	30,1% (16)	
ff	6,2% (5)	12,2% (9)	13,3% (7)	
FF x Ff + ff	42 x 35+5	39 x 26+9	30 x 16+7	0,980 [§] 0,663 [¥]
ff x Ff + FF	5 x 35+42	9 x 26+39	7 x 16+30	0,297 [§] 0,267 [¥]
%F	72,5% (119)	70,2% (104)	71,7% (76)	0,747 [§]
%f	27,5% (45)	29,8% (44)	28,3% (30)	0,987 [¥]

Source: Search Data, 2017. CM: Control Mothers. ML/P: Mothers of the group of Cleft Lips and Cleft Lips and Palate. MP: Mothers of the group of Cleft Palate isolated. CC: Children Control. CL/P: Children of the group of Cleft Lips and Cleft Lips and Palate. CP: Children of the group of Cleft Palate isolated. [‡] CM versus ML/P. [‡] CM versus MP. [§] CC versus CL/P. [¥] CC versus CP.

Table 2. Analysis of the rs1544410 genotypes in both mothers and children.

rs1544410				
	CM	ML/P	MP	p
BB	28% (23)	32,4% (24)	20,7% (11)	
Bb	53,6% (44)	42% (31)	43,3% (23)	
bb	18,4% (15)	25,6% (19)	36% (19)	
BB x Bb + bb	23 x 44+15	24 x 31+19	19 x 23+11	0,673 [‡] 0,443 [‡]
bb x Bb + BB	15 x 44+23	19 x 31+24	11 x 23+19	0,357 [‡] 0,896 [‡]
%B	54,9% (90)	53,3% (79)	42,4% (45)	0,879 [‡] 0,061 [‡]
%b	45,1% (74)	46,7% (69)	57,6% (61)	
	CC	CL/P	CP	p
BB	28% (23)	28,3% (21)	9,4% (5)	
Bb	44% (36)	42% (31)	47,1% (25)	
bb	28% (23)	29,7% (22)	43,5% (23)	
BB x Bb + bb	23 x 36+23	21 x 31+22	5 x 25+23	0,936 [§] 0,017^{¥*}
bb x Bb + BB	23 x 36+23	22 x 31+21	23 x 25+5	0,956 [§] 0,098 [¥]
%B	50% (82)	49,3% (73)	33% (35)	0,995 [§] 0,008^{¥*}
%b	50% (82)	50,7% (75)	67% (71)	

Source: Search Data, 2017. Chi-square Test.(*) p < 0,05 = significant. CM: Control Mothers. ML/P: Mothers of the group of Cleft Lips and Cleft Lips and Palate. MP: Mothers of the group of Cleft Palate isolated. CC: Children Control. CL/P: Children of the group of Cleft Lips and Cleft Lips and Palate. CP: Children of the group of Cleft Palate isolated. [‡] CM versus ML/P. [‡] CM versus MP. [§] CC versus CL/P. [¥] CC versus CP.

DISCUSSION

Vitamin D is an important hormone for the gestation period, since it helps in the implantation of the embryo in the uterus, ossification of the fetal skeleton, prevents fetal rejection and abortion, as well as the insufficiency of this vitamin is associated with several complications in pregnancy (Bodnar et al., 2009; Shin et al., 2010).

The rs2228570 polymorphism results from the thymine-cytosine (T-C) substitution at the junction of intron 1 with exon 2 at position 30920 (Arai et al., 1997).

In the analysis of rs1544410, the BB genotype appeared as a protector against CP occurrence but not for CL/P and the presence of the b allele meant increased risk for the same condition. The rs1544410 is located at intron 8, position 63980, and results in the exchange of the adenine nucleotide for a guanine (A-G) (Uitterliden et al., 2004). Since this polymorphism is located into a non-coding region of the gene, it does not cause alteration in the amino acid sequence of the synthesized polypeptide chain, but appears to affect the number of replicates in the poly A tail of messenger RNA, affecting its stability (Vuolo et al., 2012).

Although there are no previous studies on VDR polymorphisms in nonsyndromic CL/P and CP, Rosenfeld et al (2017) showed that women with a history of spontaneous abortion have a significantly increased risk for preterm birth if the newborn has BB or bb genotypes compared to Bb genotype, showing an important relationship of the genotype of the VDR gene with fetal development.

The allele b of rs1544410, identified in this study as potentially related to the occurrence of CF, has been related to other clinical conditions that have as a common characteristic the increased inflammatory activity, as in autoimmune diseases, Lupus-related Nephritis (Huang et al., 2002), And Systemic Lupus Erythematosus (Kaleta et al., 2013) and obesity (Al-Daghri et al., 2014). However, there is no consensus in these associations and another study points to the B allele as the risk allele for Systemic Lupus Erythematosus (Azad et al., 2016) and autoimmune thyroid disease (Feng et al., 2013).

Oxidative stress has been associated with orofacial clefts in the literature. Hozyasz et al. (2003) demonstrated a state of systemic oxidative stress in mothers of children with CL/P even 6 months after the birth of the child. In addition, studies have found an association of obese mothers with increased risk of having a child with CL, CLP or CP (Stott-Miller et al., 2010). The production of free radicals that results in oxidative stress can cause damage to cellular components, leading to several metabolic and inflammatory changes (Velloso et al., 2013).

The relationship between VDR genotypes and oxidative stress has been described. In studies by Medeiros Cavalcante et al. (2015) it was observed that women with BB and Bb

genotype for rs1544410 polymorphism when combined with high-dose vitamin D supplementation had reduced inflammatory markers and increased total antioxidant capacity compared to those with bb genotype. For the polymorphism rs2228570, an analysis in diabetics showed association of allele F with elevation of oxidative stress (Soroush et al., 2017).

We did not observe association of rs2228570 as a potential risk for CL/P and CF. The presence of this polymorphism produces an altered vitamin D receptor, where the f-VDR form, produces a VDR of 427 amino acids complete form, and the F-VDR form which only presents an initiation codon due to a T-to-C substitution at 5'ATG, results in a 424 aminoacids protein. This structural modification results in greater functionality of the vitamin D receptor in the form F (Arai et al., 1997; Van Etten et al., 2007).

Studies that analyze the relationship of VDR gene polymorphisms with gestational conditions or outcomes are scarce. Manzon et al. (2014) showed that the F allele promotes maternal risk to preterm birth, since this genotype may result in a defect in placental function. The F allele also appeared as a potential protector of toxic effects to the fetus in pregnant women exposed to lead (Kaya-Akyuzlu et al., 2015).

Thus, this is the first study to relate VDR gene polymorphisms with CL/P and CP. The main weakness of the study is related to the reduced experimental number, but the results suggest that the rs1544410 polymorphism is associated with the development of CP.

REFERENCES

Aidar M, Line SR. 2007. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* 18:148–152.

Al-Daghri NM, Guerini FR, Al-Attas OS, Alokail MS, Alkharfy KM, Draz HM, Agliardi C, Costa AS, Saule I, Mohammed AK, Biasin M, Clerici M. 2014. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Obesity and Inflammation Activity. *Plos One* 9:1-7.

Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, Tonai T, Nishisho T, Mori S, Takeda E. 1997. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J. Bone Miner Res* 12:915–921.

Azad SF, Ali YF, Farghaly MAA, Hamed ME, Allah MAN, Emam AA, Abdelsalam NI, Hashem MIA, Gawish HH, Nabil RM, Kamel LM, Fahmy DS, Alsayed SF, Azizi NMA, Al-Kad GM, Noah MA, Abdelrahman HM, Ahmed AR, Bendary EA. 2016. Vitamin D receptor gene bsmi polymorphisms in egyptian children and adolescents with systemic lupus erythematosus: a case-control study. *Medicine* 95:1-7.

Bezerra FF, Cabello GMK, Mendonça LMC, Donangelo CM. 2008. Bone Mass and Breast Milk Calcium Concentration Are Associated with Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Adolescent Mothers. *The Journal of Nutrition* 138:277-281.

Bhaskar LVKS, Murthy J, Babu GV. 2011. Polymorphisms in genes involved in folate metabolisms and orofacial clefts. *Science Direct* 56:723-737.

Bodnar LM, Krohn MA, Simhan HN. 2009. Maternal vitamin D deficiency is associated with bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy. *J Nutr* 139:1157–1161.

Bouillon R, Eelen G, Verlinden L, Mathieu C, Carmeliet G, Verstuyf A. 2006. Vitamin D and cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:156-162.

Feng M, Li H, Chen S, Li W, Zhang, F. 2013. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Endocrine* 43:318-326.

Hozyasz KK, Chelchowska M, Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Dudkiewicz Z, Laskowska-Klita T. 2004. Oxidative DNA damage in mothers of children with isolated orofacial clefts. *Przeql Lek* 12:1310-1313.

Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. 2002. No association of vitamin D receptor gene start codon fok 1 polymorphisms in Chinese patientes with systemic lúpus erythematosus. *J Rheumatol* 29:1211-1213.

Kaleta B, Bogaczewicz J, Robak E, Sysa-Jedrzejowska A, Wrzosek M, Szubieralska W, Mróz P, Lukaszkiwicz J, Wozniacka A. 2013. Vitamin D Receptor Gene BsmI Polymorphism in Polish Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Endocrinology* 2013:1-5.

Kaya-Akyuzlu D, Kayaalti Z, Soylemez E, Koca D, Soylemezoglu T. 2015. Does maternal VDR FokI single nucleotide polymorphism have an effect on lead levels of placenta, maternal and cord bloods? *Placenta* 36:810-875.

Manzon L, Altarescu G, Tevet A, Schimmel MS, Elstein D, Samueloff A, Grisaru-Granovsky S. 2014. Vitamin D receptor polymorphism FokI is associated with spontaneous idiopathic preterm birth in an Israeli population. *Eur Journal of Obst & Gynec and Reprod Biol* 177:84-88.

Medeiros Cavalcante IG, Silva AS, Costa MJ, Persuhn DC, Issa CT, de Luna Freire TL, da Conceição Rodrigues Gonçalves M. 2015. Effect of vitamin D3 supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency: Vitamin D3 megadose reduces inflammatory markers. *Exp Gerontol* 66:10-16.

Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, Badenhop K. 2000. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 49:504-507.

Rosenfeld T, Salem H, Altarescu G, Grisaru-Granovsky S, Tevet A, Birk R. 2017. Maternal-fetal vitamin D receptor polymorphisms significantly associated with preterm birth. *Arch Gynecol Obstet* 1:1-8.

Sablok A, Batra A, Thariani K, Batra A, Bharti R, Aggarwal AR, Kabi BC, Chellani H. 2015. Supplementation of Vitamin D in pregnancy and its correlation with feto-maternal outcome. *Clinical Endocrinology* 83:536-541.

Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. 2010. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta* 31:1027-1034.

Soroush N, Radfar M, Hamidi AK, Abdollahi M, Qorbani M, Razi F, Esfahani EN, Amoli MM. 2017. Vitamin D receptor gene FokI variant in diabetic foot ulcer and its relation with oxidative stress. *Gene* 599:87-91.

Stott-Miller M, Heike CL, Kratza M, Starr JR. 2010. Increased risk of orofacial clefts associated with maternal obesity: case-control study and Monte Carlo-based bias analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 24:502-512.

Uitterlinden AG, Frang Y, Van Meurs JB, Pols HÁ, Van Leeuwe, JP. 2004. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 388:143-156.

Van Etten E, Verlinden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB, Overbergh L, Verstuyf A, Bouillon R, Roep BO, Badenhoop K, Mathieu C. 2007. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol* 37:395-405.

Velloso JCR, Parabocz GC, Mamente FA, Ribas JT, Lima LW. 2013. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 34:305-312.

Vuolo L, Somma CD, Colao A. 2012. Vitamin D and Cancer. *Front Endocrinol* 3:58-102.

REFERÊNCIAS

ABBASI, M.; REZAIEYAZDI, Z.; AFSHARI, J. T.; HATEF, M.; SAHEBARI, M.; SAADATI, N. Lack of association of vitamin d receptor gene *BsmI* polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatol Int**, v 30, p 1537-1539, 2010.

AFSHAR, M.; BRUGMANN, S. A.; HELMS, J. A. **Plastic Surgery**. Seattle: Elsevier, 3 ed, v 3, 2012.

AIDAR, M.; LINE, S. R. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. **Braz Dent J**, v 18, n 2, p 148-52, 2007.

AL-DAGHRI, N. M.; GUERINI, F. R.; AL-ATTAS, O. S.; ALOKAIL, M. S.; ALKHARFY, K. M.; DRAZ, H. M.; AGLIARDI, C.; COSTA, A. S.; SAULLE, I.; MOHAMMED, A. K.; BIASIN, M.; CLERICI, M. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Obesity and Inflammation Activity. **Plos One**, v 9, n 7, p 1-7, 2014.

ALIMIRAH, F.; PENG, X.; MURILLO, G.; MEHTA, R. G. Functional Significance of Vitamin D Receptor FokI Polymorphism in Human Breast Cancer Cells. **Plos One**, v 6, n 1, p 16-24, 2011.

ARAI, H.; MIYAMOTO, K.; TAKETANI, Y.; YAMAMOTO, H.; IEMORI, Y.; MORITA, K.; TONAI, T.; NISHISHO, T.; MORI, S.; TAKEDA, E. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. **J. Bone Miner Res.**, v 12, p 915-921, 1997.

ARJUMAND, W.; AHMAD, S. T.; SETH, A.; SAINI, A. K.; SULTANA, S. Vitamin d receptor fokI and bsmI gene polymorphism and its association with grade and stage of renal cell carcinoma in north Indian population. **Tumor Biol**, v 33, p 23-31, 2012.

ARMAS, L. A.; HOLLIS, B. W.; HEANEY, R. P. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. **J Clin Endocrinol Metab.**, v, 89, n 11, p 5387-91, 2004.

ASLANI, S.; HOSSEIN-NEZHAD, A.; MIRZAEI, K.; MAGHBOOLI, Z.; AFSHAR, A. N.; KARIMI, F. VDR FokI polymorphism and its potential role in the pathogenesis of gestational diabetes mellitus and its complications. **Gynecol Endoc**, v 27, n 12, p 1055-1060, 2011.

AUDI, L.; MARTI, G.; ESTEBAN, C.; OYARZABAL, M.; CHUECA, M.; GUSSINYE, M.; YESTE, D. VDR gene polymorphism at exon 2 start codon (FokI) may have influenced type 1 diabetes mellitus susceptibility in two Spanish populations. **Diabet. Med.**, v 21, p 393–394, 2004.

AZAD, S. F.; ALI, Y. F.; FARGHALY, M. A. A.; HAMED, M. E.; ALLAH, M. A. N.; EMAM, A. A.; ABDELSALAM, N. I.; HASHEM, M. I. A.; GAWISH, H. H.; NABIL, R. M.; KAMEL, L. M.; FAHMY, D. S.; ALSAYED, S. F.; AZIZI, N. M. A.; AL-KAD, G. M.; NOAH, M. A.; ABDELRAHMAN, H. M.; AHMED, A. R.; BENDARY, E. A. Vitamin D receptor gene bsmi polymorphisms in egyptian children and adolescents with systemic lupus erythematosus: a case-control study. **Med**, v 95, n 46, p 1-7, 2016.

BAKER, A. M.; HAERI, S.; CAMARGO, C. A. JR.; ESPINOLA, J. A.; STUEBE, A. M. A nested case-control study of midgestation vitamin d deficiency and risk of severe preeclampsia. **The J of Clinic Endoc and Metabol.**, v 95, n 11, p 5105-5109, 2010.

BAKER, A. R.; MCDONNELL, D. P.; HUGHES, M.; CRISP, T. M.; MANGELSDORF, D. J.; HAUSSLER, M. R.; PIKE, J. W.; SHINE, J.; O'MALLEY, B. W. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin d receptor. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v 85, n 3, p 294-298, 1988.

BARNETT, Y. A.; KING, C. M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. **Mut Research**, v. 338, n.1-6, p.115-128, 1995.

BARROS, D. C.; PEREIRA, R. A.; GAMA, S. G. N.; LEAL, M. C. O consumo alimentar de gestantes adolescentes no município do Rio de Janeiro. **Cad Saúde Pública**, v 20, n 1, p 121-129, 2004.

BERK, N. W.; MARAZITA, E. M. L. Costs of cleft lip and palate: personal and societal implications. **Cleft Lip & Palate**, p. 458-467, 2002.

BHASKAR, L. V. K. S.; MURTHY, J.; BABU, G. V. Polymorphisms in genes involved in folate metabolisms and orofacial clefts. **Science Direct**, v 56, p 723-737, 2011.

BINH, T. Q.; NAKAHORI, Y.; HIEN, V. T. T.; KHAN, N. C.; LAM, N. T.; MAI, L. B.; YAMAMOTO, S. Correlations between genetic variance and adiposity measures, and gene x gene interactions for obesity in postmenopausal Vietnamese women. **J of Genetics**, v 90, n 1, 2011.

BIRNBAUM, S.; REUTTER, H.; LAUSTER, C.; SCHEER, M.; SCHIMIDT, G.; SAFFAR, M.; MARTINI, M.; HEMPRICH, A.; HENSCHKE, H.; KRAMER, F.; MANGOLD, E. Mutation Screening in the IRF6-Gene in Patients With Apparently Nonsyndromic Orofacial Clefts and a Positive Family History Suggestive of Autosomal-Dominant Inheritance. **American J of Medic Gen Part**, v 146, p 787–790, 2007.

BLOMBERG, M. I.; KALLÉN, B. Maternal obesity and morbid obesity: the risk for birth defects in the offspring. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.**, v 88, n 1, p 35-40, 2010.

BLOMBERG, J. M.; NIELSEN, J. E.; JØRGENSEN, A.; RAJPERT-DE-MEYTS, E.; KRISTENSEN, D. M.; JØRGENSEN, N. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. **Hum Reprod.** v 25, p 1303-11, 2010.

BODNAR, L. M.; CATOV, J. M.; SIMHAN, H. N.; HOLICK, M. F.; POWERS, R. W.; ROBERTS, J. M. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. **The J of Clinic Endoc and Metabol**, v 92, n 9, p 3517–22, 2007.

BODNAR, L. M.; KROHN, M. A.; SIMHAN, H. N. Maternal vitamin D deficiency is associated with bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy. **J Nutr.**, v 139, p 6, p 1157–61, 2009.

BOUILLON, R.; CARMELIET, G.; VERLINDEN, L.; VAN ETTEN, E.; VERSTUYF, A.; LUDERER, H. F. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocr Rev.**, v 29, n 6, p 726-76, 2008.

BOUILLON, R.; EELEN, G.; VERLINDEN, L.; MATHIEU, C.; CARMELIET, G.; VERSTUYF, A. Vitamin D and cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v 102, n 1-5, p 156-162, 2006.

BOYLES, A. L.; DEROO, L. A.; LIE, R. T.; TAYLOR, J. A.; JUGESSUR, A.; MURRAY, J. C.; WILCOX, A. J. Maternal Alcohol Consumption, Alcohol Metabolism Genes, and the Risk of Oral Clefts: A Population-based Case-Control Study in Norway, 1996–2001. **Am J Epidemiol**, v 172, n 8, p 924-931, 2010.

BRASIL, 2017. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC, 344, 13 de dezembro de 2002). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, DF: Senado 2002.

BRITO, L. A. **Identificação de genes de suscetibilidade às fissuras labiopalatinas não sindrômicas: influência da epidemiologia e da estratificação populacional**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BURG, M. L.; CHAI, Y.; YAO, C. A.; MAGEE, W.; FIGUEIREDO, J. C. Epidemiology, etiology, and treatment of isolated cleft palate. **Frontiers in Physiol**, v 7, n 67, p 1-41, 2016.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Rev. Cancer**, v 11, p 85–95, 2011.

CARINCI, F.; SCAPOLI, L.; PALMIERI, A.; ZOLLINO, I.; PEZZETTI, F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 71, n 10, p 1509-19, 2007.

CASTILLA, E. E.; LOPEZ-CAMELO, J. S.; PAZ, J. E. Atlas geográfico de las malformaciones congénitas en Sudamérica. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, p 56-9, 1995.

CEDERGREN, M.; KÄLLÉN, B. Maternal obesity and the risk for orofacial clefts in the offspring. **Cleft Palate Craniofac J**, v 42, n 4, p 367-71, 2005.

CHEN, J.; WANG, J.; KIM, T. K.; TIEU, E. W.; TANG, E. K.; LIN, Z.; KOVACIC, D.; MILLER, D. D.; POSTLETHWAITE, A.; TUCKEY, R. C.; SLOMINSKI, A. T.; LI, W. Novel vitamin D analogs as potential therapeutics: metabolism, toxicity profiling, and antiproliferative activity. **Anticancer Res.**, v 34, n 5, p 2153-63, 2014.

CHEVRIER, C.; DANANCHÉ, B.; BAHUAU, M.; NELVA, A.; HERMAN, C.; FRANCANNET, C.; ROBERT-GNANSIA, E.; CORDIER, S. Occupational exposure to organic solvent mixtures during pregnancy and the risk of non-syndromic oral clefts. **Occup Environ Med**, v 63, n 9, p 617-623, 2006.

CHRISTENSEN, K. Methodological issues in epidemiological studies of oral clefts. **Cleft Lip and Palate: From Origin to Treat**, p 101-107, 2002.

CHUNG, K. C.; KOWALSKI, C. P.; KIM, H. M.; BUCHMAN, S. R. Maternal Cigarette Smoking during Pregnancy and the Risk of Having a Child with Cleft Lip/Palate. **Plastic & Reconstr. Surgery**, v 105, n 2, p 485-491, 2000.

CORDIER, S.; HA, M. C.; AYME, S.; GOUJARD, J. Maternal occupational exposure and congenital malformations. **Scand J Work Environ Health**, v 18, n 1, p 11-17, 1992.

CYMROT, M.; SALES, F. C. D.; TEIXEIRA, F. A. A.; TEIXEIRA-JUNIOR, F. A. A.; TEIXEIRA, G. S. B.; FILHO, J. F. C.; OLIVEIRA, N. H. Prevalência dos tipos de fissure em pacientes com fissuras labiopalatinas atendidos em um Hospital Pediátrico do Nordeste brasileiro. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, v 25, n 4, p 648-51, 2010.

DAI, L.; ZHU, J.; MAO, M.; LI, Y.; DENG, Y.; WANG, Y.; LIANG, J.; TANG, L.; WANG, H.; KILFOY, B. A.; ZHENG, T.; ZHANG, Y. Time trends in oral clefts in Chinese newborns: data from the Chinese National Birth Defects Monitoring Network. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v 88, n 1, p 41-7, 2010.

DE FERRANTI, S.; MOZAFFARIAN, D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. **Clinic Chemistry**, v 4, p 945–955, 2008.

DENNERY, P. A. Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v 81, p 155-62, 2007.

DEROO, L. A.; GAUDINO, J. A.; EDMONDS, L. D. Orofacial cleft malformations: associations with maternal and infant characteristics in Washington State. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v 67, n 9, p 637-42, 2003.

DEROO, L. A.; WILCOX, A. J.; DREVON, C. A.; LIE, R. T. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. **Am J Epidemiol**, v 168, n 6, p 638-646, 2008.

DEROO, L. A.; WILCOX, A. J.; LIE, R. T.; ROMITTI, P. A.; PEDERSEN, D. A.; MUNGER, R. G.; MORENO URIBE, L. M.; WEHBY, G. L. 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**, v 31, n 10, p 1021-1034, 2016.

DIXON, M.; MARAZITA, M. L.; BEATY, T. H.; MURRAY, J. C. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. **Nat Rev Genet**, v 12, p167-178, 2011.

DUARTE, R.; LEAL, M. J. Leque das malformações congénitas associadas às fissuras lábio alvéolo palatinas. **Acta Med. Port.**, v 12, p 147-154, 1999.

EYLES, D. W.; BURNE, T. H.; MCGRATH, J. J. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. **Front Neuroendoc.** v 34, n 1, p 47-64, 2013.

FELDMAN, D.; KRISHNAN, A.V.; SWAMI, S.; GIOVANNUCCI, E.; FELDMAN, B.J. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. **Nat. Rev. Cancer**, v 14, p 342–357, 2014.

FEDIRKO, V.; BOSTICK, R. M.; LONG, Q.; DANA FLANDERS, W. D.; MCCULLOUGH, M. L.; SIDELNIKOV, E.; DANIEL, C. R.; RUTHERFORD, R. E.; SHAUKAT, A. Effects of Supplemental Vitamin D and Calcium on Oxidative DNA Damage Marker in Normal Colorectal Mucosa: A Randomized Clinical Trial. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v 19, n 1, p 280-291, 2010.

FENG, M.; LI, H.; CHEN, S.; LI, W.; ZHANG, F. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. **Endocrine**, v 43, p 318-326, 2013.

FIGUEIREDO, R. F.; FIGUEIREDO, N.; FEGURI, A.; BIESKI, I.; MELLO, R.; ESPINOSA, M.; DAMAZO, A. S. The role of the folic acid to the prevention of orofacial cleft: an epidemiological study. **Oral Dis**, v 21, n 2, p-240-247, 2015.

FIGUEIREDO, J. C.; LY, S.; MAGEE, K. S.; IHENACHO, U.; BAURLEY, J. W.; SANCHEZ-LARA, P. A.; BRINDOPKE, F.; NGUYEN, T. H.; NGUYEN, V.; TANGCO, M. I.; GIRON, M.; ABRAHAMS, T.; JANG, G.; VU, A.; ZOLFAGHARI, E.; YAO, C. A.; FOONG, A.; DECLERK, Y. A.; SAMET, J. M.; MAGEE, W. Parental risk factors for oral clefts among Central Africans, Southeast Asians, and Central Americans. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v 103, n 10, p 863-879, 2015.

FISCHER, D.; SCHROER, A.; LÜDDERS, D.; CORDES, T.; BÜCKER, B.; REICHRATH, J.; FRIEDRICH, M. Metabolism of vitamin D₃ in the placental tissue of normal and preeclampsia complicated pregnancies and premature births. **Clinical and Experiment Obstet and Gynecol**, v 34, n 2, p 80-84, 2007.

FINKEL, T. Signal transduction by mitochondrial oxidants. **J. Biol. Chem**, v 287, p 4434–4440, 2012.

FILUS, A.; TRZMIEL, A.; KULICZKOWSKA-PLAKSEJ, J.; TWOROWSKA, U.; JEŁDRZEJUK, D.; MILEWICS, A.; MEDRAS, M. Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. **The Aging Male**, v 11, n 3, p 134-139, 2008.

FLINT, P. W.; HAUGHEY, B. H.; LUND, V. J.; NIPARKO, J. K.; RICHARDSON, M. A.; ROBBINS, K. T.; THOMAS, J. R. **Cummings Otolaryngol: Head & Neck Surgery**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 5 ed, v 3, 2010.

FORRESTER, M. B.; MERZ, R. D. Descriptive epidemiology of oral clefts in a multiethnic population, Hawaii, 1986-2000. **Cleft Palate Craniofac**, v 41, n. 6, p 622-8, 2004.

FONSECA, V. M.; SICHIERI, R.; BASILIO, L.; RIBEIRO, L. V. C. Consumo de folato em gestantes de um hospital público do Rio de Janeiro. **Rev Bras Epidemiol**, v 6, p 319-27, 2003.

FOTSIS, T.; PEPPER, M. S.; AKTAS, E.; BREIT, S.; RASKU, S.; ADLERCREUTZ, H.; WAHALA, K.; MONTESANO, R.; SCHWEIGERER, L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. **Cancer Research**, v 57, n 14, p 2916-2921, 1997.

FUEZ, J.; WISSER, J.; HEUFELDER, A.; JOBA, W.; ZIMMERMANN, R.; VON MANDACH, U. Vitamin D receptor genotype BB is associated with higher serum osteocalcin in first pregnancy. **J Perinat Med**, v 37, n 5, p 491-495, 2009.

FUJIMORI, E.; LAURENTI, D.; CASSANA, L. M. N.; OLIVEIRA, I. M. V.; SZARFARC, S. C. Anemia e deficiência de ferro em gestantes adolescentes. **Rev de Nutrição**, v 13, n 3, p 177-84, 2000.

GARCIA, E. G.; ALMEIDA, W. F. Exposição dos trabalhadores rurais aos agrotóxicos no Brasil. **Rev Bras Saúde Ocup**, v 19, n 72, p 7-11, 1991.

GLADSTONE, J.; NULMAN, I.; KOREN, G. Reproductive risks of binge drinking during pregnancy. **Reprod Toxicol**, v 10, p 3-13, 1996.

GÓMEZ-VAQUERO, C.; FITER, J.; ENJUANES, A.; NOGUÉS, X.; DÍEZ-PÉREZ, A. NOLLA, J. M. Influence of the BsmI polymorphism of the vitamin D receptor gene on rheumatoid arthritis clinical activity. **The J of Rheumatol**, v 34, n 9, p 1823-1826, 2007.

GORLIN, R. J.; COHEN JR, M. M.; HENNEKAM, R. C. M. **Syndromes of the head and neck**. Nova York: Oxford University Press, 4 ed, p 1283, 2001.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nat Rev. Drug Discovery**, v 12, p 931-947, 2013.

GROSS, C.; ECCLESHALL, T. R.; MALLOY, P. J.; VILLA, M. L.; MARCUS, R.; FELDMAN, D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. **J. Bone Miner. Res**, v 11, p 1850-1855, 1997.

GUJA, C.; MARSHALL, S.; WELSH, K.; MERRIMAN, M.; SMITH, A.; TODD, J. A.; IONESCU-TIRGOVISTE, C. The study of CTLA-4 and vitamin D receptor polymorphisms in the Romanian type 1 diabetes population. **J. Cell. Mol. Med**. v 6, p 75-81, 2002.

HALICKA, H. D.; ZHAO, H.; LI, J.; TRAGANOS, F.; STUDZINSKI, G. P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Attenuation of constitutive DNA damage signaling by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Aging (Albany NY)**, v 4, n 4, p 270-278, 2012.

HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. Redox regulation of mitochondrial function. **Antioxid. Redox Signal**, v 16, p. 1323–1367, 2012.

HART, P. H.; LUCAS, R. M.; WALSH, J. P.; ZOSKY, G. R.; WHITEHOUSE, A. J.; ZHU, K.; ALLEN, K. L.; KUSEL, M. M.; ANDERSON, D.; MOUNTAIN, J. A. Vitamin D in fetal development: findings from a birth cohort study. **Pediatrics**, v 135, n 1, p 167-173, 2015.

HOBBS, C. A.; CHOWDHURY, S.; CLEVES, M. A.; ERICKSON, S.; MACLEOD, S. L.; SHAW, G. M.; SHETE, S.; WITTE, J. S.; TYCKO, B. Genetic epidemiology and nonsyndromic structural birth defects: from candidate genes to epigenetics. **JAMA Pediatr**, v 168, n 4, p 371–377, 2014.

HONEIN, M. A.; RASMUSSEN, S. A.; REEFHUIS, J.; ROMITTI, P. A.; LAMMER, E. J.; SUN, L.; CORREA, A. Maternal Smoking and Environmental Tobacco Smoke Exposure and the Risk of Orofacial Clefts. **Epidemiology**, v 18, n 2, p266-233, 2007.

HONEIN, M. A.; DEVINE, O.; GROSSE, S. D.; REEFHUIS, J. Prevention of Orofacial Clefts Caused by Smoking: Implications of the Surgeon General's Report. **Birth Defects Research**, v 100, p 822-825, 2014.

HONG, Y. J.; KANG, E. S.; JI, M. J.; CHOI, H. J.; OH, T.; KOONG, S.; JEON, H. J. Association between Bsm1 Polymorphism in Vitamin D Receptor Gene and Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in Korean Population. **Endocrinol Metab**, v 30, p 469-474, 2015.

HOZYASZ, K. K.; GAJEWSKA, J.; AMBROSZKIEWICZ, J.; DUDKIEWICZ, Z. High serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in mothers of children with cleft lip. **Br J Oral Maxillofac Surg.**, v 41, p 205-6, 2003.

HOZYASZ, K. K.; CHEŁCHOWSKA, M.; AMBROSZKIEWICZ, J.; GAJEWSKA, J.; DUDKIEWICZ, Z.; LASKOWSKA-KLITA, T. Oxidative DNA damage in mothers of children with isolated orofacial clefts. **Przeql Lek.**, v 12, p 1310-3, 2004.

HUANG, C. M.; WU, M. C.; WU, J. Y.; TSAI, F. J. No association of vitamin D receptor gene start codon fok 1 polymorphisms in Chinese patients with systemic lúpus erythematosus. **J Rheumatol.**, v 29, n 6, p 1211-3, 2002.

HWANG, B. F.; JAAKKOLA, J. J. K. Water chlorination and birth defects: a systematic review and meta-analysis. **Arch Environ health**, v 58, p 83-91, 2003.

INOUE, N.; WATANABE, M.; ISHIDO, N.; KATSUMATA, Y.; KAGAWA, T.; HIDAHA, Y.; IWATANI, Y. The functional polymorphisms of VDR, GC and CYP2R1 are involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. **Clinic and Experiment Immun**, v 178, p 262-269, 2014.

JOHNSON, C. Y.; HONEIN, M. A.; HOBBS, C. A. National Birth Defects Prevention Study. Prenatal diagnosis of orofacial clefts, National Birth Defects Prevention Study, 1998-2004. **Prenat Diagn**, v 29, n 9, p 833-9, 2009.

KALETA, B.; BOGACZEWICZ, J.; ROBAK, E.; SYSA-JEDRZEJOWSKA, A.; WRZOSEK, M.; SZUBIERALSKA, W.; MRÓZ, P.; LUKASZKIEWICZ, J.; WOZNIACKA, A. Vitamin D Receptor Gene BsmI Polymorphism in Polish Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **Endocrinol**, v 2013, p 1-5, 2013.

KALLARY, E.; PIETSCHMANN, P.; TOYOKUNI, S.; BAJNA, E.; HAHN, P.; MAZZUCCO, K.; BIEGLMAYER, C.; KATO, S.; CROSS, H. S. Characterization of a vitamin D receptor knockout mouse as a model of colorectal hyperproliferation and DNA damage. **Carcinogenesis**, v 22, n 9, p 1429-35, 2001.

KAPPEN, C. Modeling anterior development in mice: diet as modulator of risk for neural tube defects. **Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.**, v 163C, n 4, p 333-356, 2013.

KARRAY, E F.; DHIFALLAH, I. B.; ABDELGHANI, K. B.; GHORBEL, I. B.; KHANFIR, M.; HOUMAN, H.; HAMZAOU, K.; ZAKRAOUI, L. Associations of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI with susceptibility to rheumatoid arthritis and Behc, et's disease in Tunisians. **Joint Bone Spine**, v 79, p 144-148, 2012.

KAWALEC, A.; NELKE, K.; PAWLAS, K.; GERBER, H. Risk factors involved in orofacial cleft predisposition – review. **Open Med.**, v 10, p 163-175, 2015.

KAYA-AKYUZLU, D.; KAYAALTI, Z.; SOYLEMEZ, E.; KOCA, D.; SOYLEMEZOGLU, T. Does maternal VDR FokI single nucleotide polymorphism have an effect on lead levels of placenta, maternal and cord bloods? **Placenta**, v 36, p 810-875, 2015.

KESAEWALA, A. H.; KRISHNA, M. C.; MITCHELL, J. B. Oxidative stress in oral diseases. **Oral Dis.**, v 22, p 9-18, 2016.

KLOTZ, J. B.; PYRCH, L. A. Neural tube defects and drinking water disinfection by-products. **Epidemiology**, v 10, p 383-390, 1999.

KRAPLES, I. P. C.; ROOIJ, I. A. L. M. V.; OCKÉ, M. C.; WEST, C. E.; HORST, C. M. A. M. V. D.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Maternal Nutritional Status and the Risk for Orofacial Cleft Offspring in Humans. **The J of Nutrition**, v 134, p 3106-3113, 2004.

LACZMANSKA, I.; LACZMANSKI, L.; BEBENEK, M.; KARPINSKI, P.; CZEMARMAZOWICZ, H.; RAMSEY, D.; MILEWICZ, A.; SASIADEK, M. M. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to the risk of colorectal cancer in the Polish population. **Tumor Biol**, v 35, p 12397-12401, 2014.

LAMBERG-ALLARDT, C.; BRUSTAD, M.; MEYER, H. E.; STEINGRIMSDOTTIR, L. Vitamin D - A systematic literature review for the 5th edition of the Nordic Nutrition Recommendations. **Food Nutr. Res.**, 2013.

LAMBERS, D. S.; CLARK, K. E. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. **Semin Perinatol**, v 20, p 115-26, 1996.

LAMBERT, J. R.; KELLY, J. A.; SHIM, M.; HUFFER, W. E.; NORDEEN, S. K.; BAEK, S. J.; ELING, T. E.; LUCIA, M. S. Prostate derived factor in human prostate cancer cells: gene induction by vitamin D via a p53-dependent mechanism and inhibition of prostate cancer cell growth. **J Cell Physiol.**, v 208, p 566–574, 2006.

LEITE, I. C.; KOIFMAN, S. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz Oral Res**, v 23, n 1, p 31–37, 2009.

LEITE, I. C. G.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; KOIFMAN, S. Fendas orofaciais no recém-nascido e o uso de medicamentos e condições de saúde maternal: estudo caso-controle na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Saúde Matern Infant*, v 5, n 1, p 35-43, 2005.

LEWIN B. **Genes VII**. Porto Alegre: Art Med; 2001.

LI, Y. C.; KONG, J.; WEI, M.; CHEN, Z. F.; LIU, S. Q.; CAO, L. P. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*, v 110, p 229–238, 2002.

LI, X.; HUO, X.; LI, W.; YANG, Q.; WANG, Y.; KANG, X. The Role of the rs1544410 Polymorphism of Vitamin D Receptor Gene in Breast Cancer Susceptibility. *Cell Biochem Biophys*, v 70, p 1951-1956, 2014.

LIU, L.; WELLS, P. G. DNA oxidation as a potential molecular mechanism mediating drug-induced birth defects: phenytoin and structurally related teratogens initiate the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in vitro and in vivo in murine maternal hepatic and embryonic tissues. *Free Radic Biol Med.*, v 19, p 639-48, 1995.

LITTLE, J.; CARDY, A.; MUNGER, R. G. Tobacco smoking and oral clefts: a metaanalysis. *Bull World Health Organ*, v 82, n 3, p 213-218, 2004.

LOFFREDO, L. C. M.; SOUZA, J. M. P.; YUNES, J.; FREITAS, J. A. S.; SPIRI, W. C. Fissuras lábio-palatais: estudo caso-controle. *Rev. Saúde Pública*, v 28, p 213-217, 1994.

LORENTE, C.; CORDIER, S.; GOUJARD, J.; AYMÉ, S.; BIANCHI, F.; CALZOLARI, E. et al. Tobacco and Alcohol use during pregnancy and risk of oral cleft. *Am J Public Health*, v 90, p 415-419, 2000.

MAI, C. T.; CASSELL, C. H.; MEYER, R. E.; ISENBURG, J.; CANFIELD, M. A.; RICKARD, R.; OLNEY, R. S.; STALLINGS, E. B.; BECK, M.; HASHMI, S. S.; CHO, S. J.; KIRBY, R. S. Birth defects data from population-based birth defects surveillance programs in the United States, 2007 to 2011: highlighting orofacial clefts. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.*, v 100, n 11, p 895–904, 2014.

MAIER, S. E.; WEST, J. R. Drinking patterns and alcohol-related birth defects. *Alcohol Res Health*, v 25, p 168-74, 2001.

MANGOLD, E.; LUDWIG, K. U.; BIRNBAUM, S.; BALUARDO, C.; et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. **Nat Genet.** v 42, p 24–26, 2010.

MANZON, L.; ALTARESCU, G.; TEVET, A.; SCHIMMEL, M. S.; ELSTEIN, D.; SAMUELOFF, A.; GRISARU-GRANOVSKY, S. Vitamin D receptor polymorphism FokI is associated with spontaneous idiopathic preterm birth in an Israeli population. **Eur J of Obst & Gynec and Reprod Biol**, v 177, p 84-88, 2014.

MARAZITA, M. L.; MOONEY, M. P. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. **Clin. Plast. Surg**, v 31, n 2, p 125–140, 2004.

MEDEIROS CAVALCANTE, I. G.; SILVA, A. S.; COSTA, M. J.; PERSUHN, D. C.; ISSA, C. T.; DE LUNA FREIRE, T. L.; GONÇALVES, M. C. R. Effect of vitamin D3 supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency: Vitamin D3 megadose reduces inflammatory markers. **Exp Gerontol**, v 66, p 10-16, 2015.

MEYER, K. A.; LEE, J. S.; DYCK, P. A.; CAO, W. Q.; RAO, M. S.; THORGEIRSSON, S. S.; REDDY, J. K. Smoking and the risk of oral clefts: exploring the impact of study designs. **Epidemiology**, v 15, n. 6, p 671 678, 2003.

MITCHELL, L. E.; BEATY, T. H.; LIDRAL, A. C.; MUNGER, R. G.; MURRAY, J. C.; SAAL, H. M. Guidelines for the design and analysis of studies on nonsyndromic cleft lip and cleft palate in humans: summary report from a workshop of the International Consortium for Oral Clefts Genetics. **Cleft Palate Craniofac J**, v 39, n. 1, p 93-100, 2002.

MIYAMOTO, K.; KESTERSON, R. A.; YAMAMOTO, H.; TAKETANI, Y.; NISHIWAKI, E.; TATSUMI, S.; INOUE, Y.; MORITA, K.; TAKEDA, E.; PIKE, J. W. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. **Mol. Endocrinol.**, v 11, p 1165–1179, 1997.

MIYAMOTO, K.; TAKETANI, Y.; ARAI, E.; YAMAMOTO, H.; IEMORI, Y.; CHIKAMORI, M.; MORITA, K.; TAKEDA, E.; TOHNA, T.; NISHISHO, T. A novel

polymorphism in the vitamin D receptor gene and bone mineral density: Study of vitamin D receptor expression and function in COS-7 cells. **J Bone Miner Res**, v 11, n 116, 1996.

MOHAPATRA, S.; SAXENA, A.; GANDHI, G.; KONER, B. C.; RAY, P. C. Vitamin D and VDR gene polymorphism (FokI) in epithelial ovarian cancer in Indian population. **J of Ovarian Research**, v 6, n 1, p 37-42, 2013.

MOSSEY, P. A.; LITTLE, J.; MUNGER, R. G.; DIXON, M. J.; SHAW, W. C. Cleft lip and palate. **Lancet**, v 374, n 9703, p 1773-1785, 2009.

MOSSEY, P. A.; CATILLA, E. E. **Global Registry and Database on Craniofacial Anomalies: Report of a WHO Registry Meeting on Craniofacial Anomalies**. Geneva: World Health Organization, 2003.

MORRIS, J. G. Ineffective vitamin D synthesis in cats is reversed by an inhibitor of 7-dehydrocholesterol- Δ^7 -reductase. **J Nutrition.**, v 129, p 903-8, 1999.

MORRISON, N. A.; YEOMAN, R.; KELLY, P. J.; EISMAN, J. A. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. **Proc Natl Acad Sci USA**, v 89, n 15, p 6665-6669, 1992.

MUNGER, R. G.; ROMITTI, P. A.; DAACK-HIRSCH, S.; BURNS, T. L.; MURRAY, J. C.; HANSON, J. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. **Teratology**, v 54, n 1, p 27-33, 1996.

MURRAY, J. C. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. **Clin Genet**, v 61, p 248-56, 2002.

NATSUME, N.; KAWAI, T.; OGI, N.; YOSHIDA, W. Maternal risk factors in cleft lip and palate: case control study. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v 38, n 1, p 23-25, 2000.

NEJENTSEV, S.; GODFREY, L.; SNOOK, H.; RANCE, H.; NUTLAND, S.; WALKER, N. M.; LAM, A. C.; et al. Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. **Hum. Mol. Genet.**, v 13, p 1633-1639, 2004.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **Am J Clin Nutr.**, v 88, p 491-9, 2008.

OGUNKOLADE, B. W.; BOUCHER, B. J.; PRAHL, J. M.; BUSTIN, S. A.; BURRIN, J. M.; NOONAN, K.; NORTH, B. V.; MANNAN, N.; MCDERMOTT, M. F.; DELUCA, H. F.; HITMAN, G. A. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. **Diabetes**. v 51, n 7, p 2294-300, 2002.

PALMER, H. G.; SANCHEZ-CARBAYO, M.; ORDONEZ-MORAN, P.; LARRIBA, M. J.; CORDON-CARDO, C.; MUNOZ, A. Genetic signatures of differentiation induced by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. **Cancer Res.**, v 63, p 7799–7806, 2003.

PANI, M. A.; KNAPP, M.; DONNER, H.; BRAUN, J.; BAUR, M. P.; USADEL, K. H.; BADENHOOP, K. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. **Diabetes**, v 49, n 3, p 504-7, 2000.

PARKER, S. E.; MAI, C. T.; CANFIELD, M. A.; RICKARD, R.; WANG, Y.; MEYER, R. E.; ANDERSON, P.; MASON, C. A.; COLLINS, J. S.; KIRBY, R. S.; CORREA, A. Updated National Birth Prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004-2006. **Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol**, v 88, p 1008–1016, 2010.

PARMIGIANI, R. B.; CAMARGO, A. A. **O genoma humano e o Câncer**. São Paulo: Editora Atheneu, 1 ed, 2004.

PEREZ-FERRE, N.; TORREJON, M. J.; FUENTES, M.; FERNANDEZ, M. D.; RAMOS, A.; BORDIU, E., DEL VALLE, L.; RUBIO, M. A.; BEDIA, A. R.; MONTAÑEZ, C.; CALLE-PASCUAL, A. L.. Association of low serum 25-Hydroxyvitamin D levels in pregnancy with glucose homeostasis and obstetric and newborn outcomes. **Endocrine Practice**. v 18, n 5, p 676–84, 2012.

POLJSAK, B.; MILISAV, I. Clinical implications of cellular stress responses. **Bosn J Basic Med Sci.**, v 12, n 2, p 122-6, 2012.

POOL-ZOBEL, B. L., BUB, A., MÜLLER, H., WOLLOWSKI, I., RECHKEMMER, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid--rich foods. **Carcinogenesis**, v 18, n 9, p 1847-1850, 1997.

PREMAOR, M. O.; FURLANETTO, T. W. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v 50, n 1, p 25-37, 2006.

REZENDE, V. B.; SANDRIM, V. C.; PALEI, A. C.; MACHADO, L.; CAVALLI, R. C.; DUARTE, G.; TANUS-SANTOS, J. E. Vitamin D receptor polymorphisms in hypertensive disorders of pregnancy. **Mol Biol Rep.** v 39, n 12, p 10903-10906, 2012.

RIBEIRO-RODA, S.; LOPES, G. S. Aspectos odontológicos das fendas labiopalatinas e orientações para cuidados básicos. **Revista de Ciências Médicas.** v 17, n 2, p 95-103, 2008.

ROCHELL, N.; WURTZ, J. M.; MITSCHLER, M.; KLAHOLZ, B.; MORAS, D. The Crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. **Mol Cell.** v 5, p 173-9, 2000.

SABBAGH, H. J.; HASSAN, M. H. A.; INNES, N. P. T.; ELKODARY, H. M.; LITTLE, J.; MOSSEY, P. A. Passive Smoking in the Etiology of Non-Syndromic Orofacial Clefts: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Plos One.** v 10, n 3, p 1-21, 2015.

SABLOK, A.; BATRA, A.; THARIANI, K.; BATRA, A.; BHARTI, R.; AGGARWAL, A. R.; KABI, B. C.; CHELLANI, H. Supplementation of Vitamin D in pregnancy and its correlation with fetomaternal outcome. **Clinic Endocrinol.** v 83, n 4, p 536-541, 2015.

SALIHU, S.; KRASNIQI, B.; SEJFIJA, O.; HETA, N.; SALIHAI, N.; GEÇI, A.; SEJDINI, M.; ARIFI, H.; ISUFI, H.; UEECK, B. A. Analysis of Potential Oral Cleft Risk Factors in the Kosovo Population. **Int Surg.** v 99, p 161-165, 2014.

SANTOS, L. M. P.; PEREIRA, M. Z. **Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural.** Caderno de Saúde Pública, v 23, n 1, p 17-24, 2007.

SCHUTZE, N.; FRITZCHE, J.; EBERT-DUMIG, R.; SCHNEIDER, D.; KOHRLE, J.; ANDREESSEN, R.; KREUTZ, M.; JAKOB, F. The selenoprotein thioredoxin reductase is expressed in peripheral blood monocytes and THP1 human myeloid leukemia cells - regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and selenite. **Biofactors.** v10, p 329-338, 1999.

SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Mol. Cell.** v. 48, p. 158-167, 2012.

SHAW, G. M.; LAMMER, E. L.; WASSERMAN, C. R. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. **Lancet**, v 346, n 8972, p 393-396, 1995.

SHAW, G. M.; LAMMER, E. J. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts. **The J of Pediatrics**, v 134, n 3, p 298-303, 1999.

SHAW, G. M. CARMICHAEL, S. L.; VOLLSET, S. E.; YANG, W., FINNELL, R. H., BLOM, H.; MIDTTUN, O.; UELAND, P. M. Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. **Am. J. Med. Genet.**, v 80, p 196-198, 1998.

SHAW, G. M.; CARMICHAEL, S. L.; VOLLSET, S. E.; YANG, W., FINNELL, R. H., BLOM, H.; MIDTTUN, O.; UELAND, P. M. Mid-pregnancy cotinine and risks of orofacial clefts and neural tube defects. **J Pediatr**, v 154, p 17-19, 2009.

SLATTERY; M. L. Vitamin D Receptor Gene (VDR) Associations with Cancer. **Nutrition Reviews**, v 65, n 8, p 102-104, 2007.

SHIN, J. S.; CHOI, M. Y.; LONGTINE, M. S.; NELSON, D. M. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. **Placenta**, v 31, p 1027-1034, 2010.

SPIELSON, S. V.; KIM, H. J.; CHUNG, K. C. Association between maternal diabetes mellitus and newborn oral cleft. **Ann Plast Surg**. v 47, p 477-481, 2001.

SPINA, V.; PSILLAKIS, J. M.; LAPA, F. S. FERREIRA, M. C. Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, v 27, n 1, p 5-6, 1972.

SILVA FILHO, O. G.; FERRARI JÚNIOR, F. M.; ROCHA, D. L.; FREITAS, J. A. S. Classificação das fissuras lábio-palatais: breve histórico, considerações clínicas e sugestões de modificação. **Rev Bras Cir**, v 82, n 2, p 51-65, 1992.

STANIER, P.; MOORE, G. E. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. **Hum Mol Genet**, v 13, n 1, p 73-81, 2004.

STOTHARD, K. J.; TENNANT, P. W.; BELL, R.; RANKIN, J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v 301, n 6, p 636-50, 2009.

STOTT-MILLER, M.; HEIKE, C. L.; KRATZA, M.; STARR, J. R. Increased risk of orofacial clefts associated with maternal obesity: case-control study and Monte Carlo-based bias analysis. **Paediatr Perinat Epidemiol.**, v 24, n 5, p 502-512, 2010.

STRACHAN, T. R. A. **Genética Molecular Humana**. Porto Alegre: Art Aed, 2 ed, 2002.

TAYLOR, J. J.; PRESHAW, P. M.; DONALDSON, P. T. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. **Periodontol** 2000; v 35, p 158-82, 2004.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **The British J of Nutrition**, v 92, p 347-355, 2004.

UITTERLINDEN, A. G.; FRANG, Y.; VAN MEURS, J. B.; POLS, H. A.; VAN LEEUWEN, J. P. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, v 388, n 2, p 143-156, 2004.

VALLINO-NAPOLI, L. D.; RILEY, M. M.; HALLIDAY, J. L. An epidemiologic study of orofacial clefts with otherbirth defects in Victoria, Australia. **Cleft Palate Craniofac J**, v 43, p 571-76, 2006.

VAN AALST, J. A.; KOLAPPA, K. K.; SADOVE, M. MOC-PSSM CME article: nonsyndromic cleft palate. **Plast. Reconstr. Surg.**, v 121, n 1, p 1-14, 2008.

VAN ETTEN, E.; VERLINDEN, L.; GIULIETTI, A.; RAMOS-LOPEZ, E.; BRANISTEANU, D. D.; FERREIRA G. B.; OVERBERGH, L.; VERSTUYF, A.; BOUILLON, R.; ROEP, B. O.; BADENHOOP, K.; MATHIEU, C. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. **Eur J Immunol**, v 37, n 2, p 395-405, 2007.

VELLOSA, J. C. R.; PARABOCZ, G. C.; MAMENTE, F. A.; RIBAS, J. T.; LIMA, L. W. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v 34, n 3, p 305-312, 2013.

VUJKOVIC, M.; OCKE, M. C.; VAN DER SPEK, P. J.; YAZDANPANA, N.; STEEGERS, E. A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. Maternal Western dietary patterns and the risk of developing a cleft lip with or without a cleft palate. **Obstet Gynecol.** v 110, n 2, p 378-384, 2007.

WAGNER, C. L.; TAYLOR, S. N.; HOLLIS, B. W. Does Vitamin D Make the World Go “Round”? **Breastfeeding Medicine**, v 3, n 4, p 239-250, 2008.

WANG, L.; MA, J.; MANSON, J. E.; BURING, J. E.; GAZIANO, J. M.; SESSO, H. D. A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor gene polymorphisms, and risk of hypertension in men. **Eur J Nutr**, v 52, p 1771-1779, 2013.

WANG, Q.; XI, B.; REILLY, K. H.; LIU, M.; FU, M. Quantitative assessment of the associations between four polymorphisms (FokI, ApaI, BsmI, TaqI) of vitamin D receptor gene and risk of diabetes mellitus. **Mol Biol Rep**, v 39, p 9405-9414, 2012.

WANG, Z.; LI, L.; LEI, X. Y.; XUE, J.; MI, H. Y. Effect of advanced maternal age on birth defects and postnatal complications of neonates. **Zhon. Dang Dai Er Ke Za Zhi**, v 18, n 11, p 1084-1089, 2016.

WEBB, A. R.; KLINE, L.; HOLICK, M. F. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. **J Clin Endocrinol Metab.**, v 67, p 373-8, 1988.

WERLER, M. M.; LOUIK, C.; MITCHELL, A. A. Achieving a public health recommendation for preventing neural tube defects with folic acid. **Am J Public Health**, v 11, p 1637–40, 1999.

WERLER, M. M. Teratogen Update: Smoking and reproductive outcome. **Teratology**, v 55, p 3828, 1997.

WILCOX, A. J.; LIE, R. T.; SOLVOLL, K.; TAYLOR, J.; MCCONNAUGHEY, R.; ABYHOLM, F.; VINDENES, H.; VOLLSET, S. E.; DREVON, C. A. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case–control study. **BMJ**, v 334, n 7591, p 464, 2007.

WIMALAWANSA, S.J. Associations of vitamin D with insulin resistance, obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v 16, p 30253-9, 2016.

WHO. **Global registry and data base on craniofacial anomalies**. Report of a WHO Registry Meeting on Craniofacial Anomalies. v 12, p 1-3, 2002.

XU, Y; SHIBATA, A; MCNEAL, J. E.; STAMEY, T. A.; FELDMAN, D; PEEHL, D. M. Vitamin D Receptor Start Codon Polymorphism (FokI) and Prostate Cancer Progression. **Cancer Epidemiology, Biomarkes & Prevention**, v 12, p 23-27, 2007.

XU, H.; LI, S.; QIU, J.; GAO, X.; ZHANG, P.; YANG, Y. The VDR gene FokI polymorphism and ovarian cancer risk. **Tumor Biol**, v 34, p 3309-3316, 2013.

YOKOYAMA, K.; NAKASHIMA, A.; URASHIMA, M.; SUGA, H.; MIMURA, T.; KIMURA, Y.; KANAZAWA, Y.; YOKOTA, T.; SAKAMOTO, M.; ISHIZAWA, S.; NISHIMURA, R.; KURATA, H.; TANNO, Y.; TOJO, K.; KAGEYAMA, S.; OHKIDO, I.; UTSUNOMIYA, K.; HOSOYA, T. Interactions between Serum Vitamin D Levels and Vitamin D Receptor Gene FokI Polymorphisms for Renal Function in Patients with Type 2 Diabetes. **Plos One**, v 7, n 12, p 11-17, 2012.

ZARANTE, I.; LOPEZ, M. A.; CARO, A.; GARCIA-REYES, J. C.; OSPINA, J. C. Impact and risk factors of craniofacial malformations in a Colombian population. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v 73, n 10, p 1434–1437, 2009.

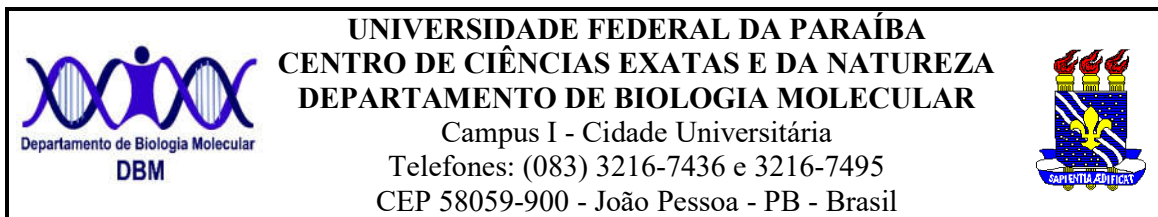
ZHIWENA, L.; JIANMENGA, L.; RONGWEIA, Y.; LEA, Z.; XIAOYINGB, Z.; AIGUO, R. Maternal Passive Smoking and Risk of Cleft Lip With or Without Cleft Palate. **Epidemiology**, v 21, n 2, p 240-242, 2010.

ZHANG, J.; LI, W.; LIU, J.; WU, W.; OUYANG, H.; ZHANG, Q.; WANG, Y.; LIU, L.; YANG, R.; LIU, X.; MENG, Q.; LU, J. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus risk: An update by meta-analysis. **Molec and Cellular Endoc**, v 355, p 135-142, 2012.

ZHONG, W.; GU, B.; GU, Y.; GROOME, L; J.; SUN, J.; WANG, Y. Activation of vitamin D receptor promotes VEGF and CuZn-SOD expression in endothelial cells. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v 140, p 56-62, 2014.

ZMUDA, J. M.; CAULEY, J. A.; FERRELL, R. E. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. **Epidemiol Rev.**, v 22, n 2, p 203-17, 2000.

APÊNDICE I



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que recebe o título: **Análise da influência de fatores genéticos na ocorrência de fendas orofaciais não sindrômicas** e que visa identificar fatores de risco relacionados a ocorrência das fendas labiais e palatinas em crianças na Paraíba. Sua participação é totalmente voluntária.

Para participar do estudo será necessário permitir a coleta de células da mucosa da boca através de bochecho com uma solução contendo açúcar. Esta solução deverá permanecer na boca por 1 minuto e depois depositada em recipiente próprio. O procedimento precisa ser realizado no pai, na mãe e na criança, para que a família possa participar do estudo. O referido procedimento é indolor. Caso seu (sua) filho (a) não consiga bochechar e cuspir a coleta será realizada esfregando levemente uma colher de plástico ou gaze estéril na mucosa oral da criança.

Esta coleta tem por objetivo extrair o DNA, que consiste de uma parte das células onde está armazenado o material genético dos seres vivos. Nela está o código que determina as características de um indivíduo.

Após realizada a coleta de células, os pesquisadores irão isolar o DNA de cada uma das amostras, e farão análises no DNA do pai, da mãe e do filho, numa região do material genético relacionada às defesas que organismo desenvolve contra a produção e radicais livres de oxigênio. Este aspecto nunca foi investigado como fator de risco para fissuras orofaciais, por este motivo, há muito interesse científico na realização desta pesquisa.

Além da análise do DNA, será necessário responder um questionário contendo perguntas sobre questões relacionadas ao período gestacional. Neste questionário constarão perguntas relacionadas a exposição da mãe do bebê a alguns fatores de risco não genéticos das fendas orais, como por exemplo álcool, medicamentos, cigarro, doenças que a mãe pode ter apresentado antes ou durante a gravidez. Será também questionada como foi a alimentação durante o período gestacional. Esta etapa do questionário visa analisar a exposição do indivíduo ao estresse oxidativo durante o período embrionário.

Toda a coleta de dados acontecerá preservando a identidade de todos os envolvidos. Todos os documentos relacionados a esta pesquisa serão consultados exclusivamente pelos pesquisadores, não sendo permitido o acesso a nenhuma outra pessoa ou entidade.

Os resultados obtidos nesta pesquisa serão exclusivamente utilizados para fins científicos, e quando divulgados não citarão em nenhum momento o nome dos sujeitos de pesquisa.

Participando ou não desta pesquisa, o tratamento e acompanhamento do (a) seu (sua) filho (a) no Serviço de Fissurados não será afetado. Não há relação de dependência entre o atendimento e participação nesta pesquisa. A opção de participar fica a critério dos pais, e mesmo que concordem, podem retirar o consentimento a qualquer momento, bastando para isso contatar a pesquisadora principal ou o Serviço de Fissurados sem a necessidade de oferecer qualquer explicação.

Caso a família deseje participar, poderá optar em ter ou não acesso aos resultados do exame do DNA. Em caso afirmativo, a equipe do Serviço de Fissurados agendará um momento oportuno após a finalização da coleta de dados para realizar a devolutiva.

O benefício gerado por esta pesquisa está na geração de informações sobre os fatores de risco que levam a ocorrência de fendas orais em crianças brasileiras. Estas informações poderão resultar no aprimoramento das ações de prevenção.

O DNA extraído será acondicionado em freezer podendo ser utilizado futuramente em outras pesquisas relacionados à fissuras orais. Neste caso, um novo projeto de pesquisa deverá ser analisado pelos órgãos competentes.

Reiteramos que a participação na pesquisa acontecerá mediante aceite do pai e da mãe a criança, da coleta de material do trio e da participação respondendo o questionário proposto.

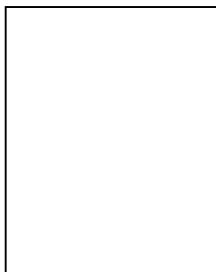
Caso preencham os dados abaixo, estarão consentindo na participação do filho e de ambos na pesquisa.

"DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE:

Eu, _____, fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci todas as minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e desistir de participar da pesquisa se assim o desejar. O pesquisador, certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais, no que se refere a minha identificação individualizada, e deverão ser tornados públicos através de algum meio. Ele compromete-se, também, seguir os padrões éticos definidos na Resolução CNS 466/12. Também sei que em caso de dúvidas poderei fazer contato com a pesquisadora responsável ou com o Comitê de Ética em Pesquisa".

Assinatura do (a) Pai/Mãe:

Impressão datiloscópica



Caso tenha dúvidas a respeito do projeto ou seu andamento, favor contactar a pesquisadora responsável, o Serviço de Fissurados (3215-7585) ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Lauro Wanderley situado neste endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley – HULW – 2º andar, Campus I, Cidade Universitária, Bairro Castelo Branco, CEP 58059-900, João Pessoa – PB (083 3216-7964, email comitedeetica@hulw.ufpb.com).

Pesquisadora responsável:

Vanessa de Melo Cavalcanti

Departamento de Biologia Molecular – UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

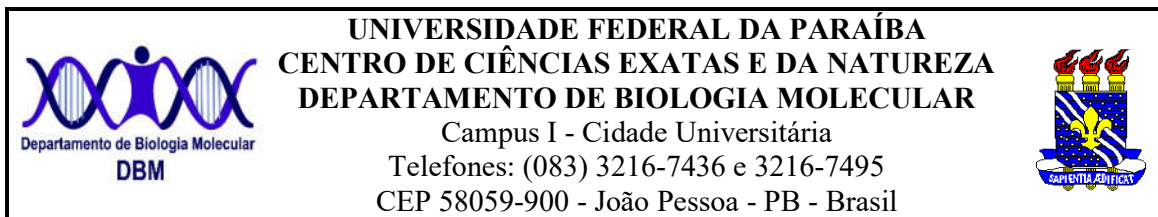
vanessa_mjp@hotmail.com

Assinatura Pesquisadora Responsável: _____

Assinatura Pesquisadora Responsável pela coleta de dados: _____

APÊNDICE II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que recebe o título: **Análise da influência de fatores genéticos na ocorrência de fendas orofaciais não sindrômicas** e que visa identificar fatores de risco relacionados a ocorrência das fendas labiais e palatinas em crianças na Paraíba. Sua participação é totalmente voluntária.

Para participar do estudo será necessário permitir a coleta de células da mucosa da boca através de bochecho com uma solução contendo açúcar. Esta solução deverá permanecer na boca por 1 minuto e depois depositada em recipiente próprio. O procedimento precisa ser realizado no pai, na mãe e na criança, para que a família possa participar do estudo. O referido procedimento é indolor. Caso seu (sua) filho (a) não consiga bochechar e cuspir a coleta será realizada esfregando levemente uma colher de plástico ou gaze estéril na mucosa oral da criança.

Esta coleta tem por objetivo extrair o DNA, que consiste de uma parte das células onde está armazenado o material genético dos seres vivos. Nela está o código que determina as características de um indivíduo.

Após realizada a coleta de células, os pesquisadores irão isolar o DNA de cada uma das amostras, e farão análises no DNA do pai, da mãe e do filho, numa região do material genético relacionada às defesas que organismo desenvolve contra a produção e radicais livres de oxigênio. Este aspecto nunca foi investigado como fator de risco para fissuras orofaciais, por este motivo, há muito interesse científico na realização desta pesquisa.

Além da análise do DNA, será necessário responder um questionário contendo perguntas sobre questões relacionadas ao período gestacional. Neste questionário constarão perguntas relacionadas a exposição da mãe do bebê a alguns fatores de risco não genéticos das fendas orais, como por exemplo álcool, medicamentos, cigarro, doenças que a mãe pode ter apresentado antes ou durante a gravidez. Será também questionada como foi a alimentação durante o período gestacional. Esta etapa do questionário visa analisar a exposição do indivíduo ao estresse oxidativo durante o período embrionário.

Toda a coleta de dados acontecerá preservando a identidade de todos os envolvidos. Todos os documentos relacionados a esta pesquisa serão consultados exclusivamente pelos pesquisadores, não sendo permitido o acesso a nenhuma outra pessoa ou entidade.

Os resultados obtidos nesta pesquisa serão exclusivamente utilizados para fins científicos, e quando divulgados não citarão em nenhum momento o nome dos sujeitos de pesquisa.

Participando ou não desta pesquisa, o tratamento e acompanhamento do (a) seu (sua) filho (a) no Serviço de Fissurados não será afetado. Não há relação de dependência entre o atendimento e participação nesta pesquisa. A opção de participar fica a critério dos pais, e mesmo que concordem, podem retirar o consentimento a qualquer momento, bastando para isso contatar a pesquisadora principal ou o Serviço de Fissurados sem a necessidade de oferecer qualquer explicação.

Caso a família deseje participar, poderá optar em ter ou não acesso aos resultados do exame do DNA. Em caso afirmativo, a equipe do Serviço de Fissurados agendará um momento oportuno após a finalização da coleta de dados para realizar a devolutiva.

O benefício gerado por esta pesquisa está na geração de informações sobre os fatores de risco que levam a ocorrência de fendas orais em crianças brasileiras. Estas informações poderão resultar no aprimoramento das ações de prevenção.

O DNA extraído será acondicionado em freezer podendo ser utilizado futuramente em outras pesquisas relacionados à fissuras orais. Neste caso, um novo projeto de pesquisa deverá ser analisado pelos órgãos competentes.

Reiteramos que a participação na pesquisa acontecerá mediante aceite do pai e da mãe a criança, da coleta de material do trio e da participação respondendo o questionário proposto.

Caso preencham os dados abaixo, estarão consentindo na participação do filho e de ambos na pesquisa.

“ANUÊNCIA DO (A) PAI/MÃE DA CRIANÇA

Eu, _____, autorizo a participação do (a) meu (minha) filho (a) _____ na pesquisa acima e fui informado dos objetivos da pesquisa de maneira clara e detalhada e esclareci todas as minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e desistir da participação do (a) meu (minha) filho (a) da pesquisa se assim o desejar. O pesquisador, certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais, no que se refere a identificação individualizada do (a) meu (minha) filho (a), e deverão ser tornados públicos através de algum meio. Também sei que em caso de dúvidas poderei fazer contato com a pesquisadora responsável ou com o Comitê de Ética em Pesquisa”.

Assinatura do (a) Pai/Mãe:

Impressão datiloscópica



Caso tenha dúvidas a respeito do projeto ou seu andamento, favor contactar a pesquisadora responsável, o Serviço de Fissurados (3215-7585) ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Lauro Wanderley situado neste endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley – HULW – 2º andar, Campus I, Cidade Universitária, Bairro Castelo Branco, CEP 58059-900, João Pessoa – PB (083 3216-7964, email comitedeetica@hulw.ufpb.com).

Pesquisadora responsável:

Vanessa de Melo Cavalcanti

Departamento de Biologia Molecular – UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

vanessa_mjp@hotmail.com

Assinatura Pesquisadora Responsável: _____

Assinatura Pesquisadora Responsável pela coleta de dados: _____

APÊNDICE III

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS ___/___/_____

1. Endereço localiza-se na Zona: 1. Urbana 2. Rural .
2. Naturalidade: _____

3. Nacionalidade da criança: Brasileira Estrangeira _____

4. Gênero da criança: 1. Masculino 2. Feminino
5. Data de nascimento da **mãe**: ___/___/___ Idade: _____
- 5.1 Idade no momento do nascimento da criança: _____
6. Data de nascimento da **pai**: ___/___/___ Idade: _____

- 6.1 Idade no momento do nascimento da criança: _____
7. Data de nascimento da **criança**: ___/___/___ Idade: _____
8. Cor da pele da **mãe**:
1. Caucasiano ; 2. Ascendência africana ; 3. Ascendência japonesa ; 4. Ascendência indígena ; 5. Outros _____

9. Cor da pele do **pai**:
1. Caucasiano ; 2. Ascendência africana ; 3. Ascendência japonesa ; 4. Ascendência indígena ; 5. Outros _____

10. Cor da pele da **criança**:
1. Caucasiano ; 2. Ascendência africana ; 3. Ascendência japonesa ; 4. Ascendência indígena ; 5. Outros _____

11. Gestação a termo: 1. Sim 2. Não Quantas semanas? _____

12. Há consanguidade entre os pais da criança? 1. Sim 2. Não
Se **Sim** qual o grau de parentesco?: _____
13. Grau de instrução da **mãe**:
13.1 1. Sem Escolaridade ; 2. E. Fundamental Incompleto ; 3. E. Fundamental Completo ; 4. E. Médio Incompleto ; 5. E. Médio Completo ; 6. E. Superior Incompleto ; 7. E. Superior Completo ; 8. Pós-Graduação _____
- 13.2 A senhora sabe ler jornal ou carta com:
() facilidade () dificuldade () não sabe ler

14. Grau de instrução do pai:

14.1 1. Sem Escolaridade ; 2. E. Fundamental Incompleto ; 3. E. Fundamental Completo ; 4. E. Médio Incompleto ; 5. E. Médio Completo ; 6. E. Superior Incompleto ; 7. E. Superior Completo ; 8. Pós-Graduação _____

18.2 A senhora sabe ler jornal ou carta com:

() facilidade () dificuldade () não sabe ler

15. Profissão da mãe:

15.1 1. Lavradora ; 2. Do lar ; 3. Estudante ; 4. Autônoma ; 5. Não se aplica ; 6. Outros .

15.2 Qual? _____

15.3 No exercício da profissão havia contato com produtos químicos: 1. Sim 2. Não

15.4 Em caso afirmativo:

Qual produto químico? _____

O contato se deu no período da gestação: 1. Sim 2. Não

Em que trimestre da gestação? 1º trimestre ; 2º trimestre ; 3º trimestre

16. Profissão do pai:

16.1 1. Lavradora ; 2. Do lar ; 3. Estudante ; 4. Autônoma ; 5. Não se aplica ; 6. Outros .

16.2 Qual? _____

16.3 No exercício da profissão havia contato com produtos químicos: 1. Sim 2. Não

16.4 Em caso afirmativo:

Qual produto químico _____

O contato se deu no período da gestação: 1. Sim 2. Não

Em que trimestre da gestação? 1º trimestre ; 2º trimestre ; 3º trimestre

17. Número de gestações: ()

18. Número de filhos vivos: ()

19. Número de aborto(s): ()

20. Número de natimorto(s): ()

21. Ordem de Paridade (incluindo aborto): (Utilizar a legenda * aborto; ** natimorto)

21.1 1º Filho: 1. Masculino ; 2. Feminino ; ____/____/____; () anos.

21.2 2º Filho: 1. Masc. ; 2. Fem. ; 3. Não se aplica . ____/____/____ 4. Fissurado Sim 2. Não

21.3 3º Filho: 1. Masc. ; 2. Fem. ; 3. Não se aplica . ____/____/____ 4. Fissurado Sim 2. Não

21.4 4º Filho: 1. Masc. ; 2. Fem. ; 3. Não se aplica . ___/___/___ 4. Fissurado Sim
2. Não

21.5 5º Filho: 1. Masc. ; 2. Fem. ; 3. Não se aplica . ___/___/___ 4. Fissurado Sim
2. Não

21.6 6º Filho: 1. Masc. ; 2. Fem. ; 3. Não se aplica . ___/___/___ 4. Fissurado Sim
2. Não

21.7 7º Filho: 1. Masc. ; 2. Fem. ; 3. Não se aplica . ___/___/___ 4. Fissurado Sim
2. Não

21.8 8º Filho: 1. Masc. ; 2. Fem. ; 3. Não se aplica . ___/___/___ 4. Fissurado Sim
2. Não

22. Renda familiar:

22.1. até um salário mínimo (incluso) ;

22.2. entre um e três salários mínimos (incluso) ;

22.3. três a cinco salários mínimos (incluso) ;

22.4. mais de cinco salários mínimos

23. Quantas pessoas moram na residência? ()

24. Há Histórico de obesidade materna? 1. Sim ; 2. Não .

24.1 Antes do filho fissurado: 1. Sim ; 2. Não ; 3. Não se aplica .

24.2 Depois do filho fissurado: 1. Sim ; 2. Não ; 3. Não se aplica .

24.3 Quantos quilos (máximo)? _____ IMC: _____

25. Há histórico de subnutrição materna? 1. Sim ; 2. Não .

25.1 Antes do filho fissurado: 1. Sim ; 2. Não ; 3. Não se aplica .

25.2 Depois do filho fissurado: 1. Sim ; 2. Não ; 3. Não se aplica .

25.3 Quantos quilos? Máximo: _____ Mínimo _____ IMC: _____

26. Altura materna: _____ Peso atual: _____ IMC atual: _____

27. Peso da criança ao nascimento: _____ Peso da Criança atual: _____

27.1 Comprimento ao nascimento: _____ Comprimento atual: _____

28. Fez uso de medicamentos durante a gestação? 1. Sim ; 2. Não .

28.1 Quais medicamentos? _____

28.2 Para tratar o quê? _____

28.3 Dosagem utilizada: _____

28.4 Tempo total de utilização: _____

28.5 Em qual trimestre da gravidez? 1. 1º trimestre ; 2. 2º trimestre ; 3. 3º trimestre .

29. Fez uso de anticoncepcional antes ou durante a gestação? 1. Sim ; 2. Não

29.1 Até que trimestre? 1º trimestre ; 2º trimestre ; 3º trimestre

29.2 Via de uso: 1. Oral ; 2. Injetável 3. Outra _____

29.3 Tempo total de utilização: _____

30. Em que semana de gestação descobriu estar grávida? _____

31. Em que semana iniciou o pré-natal? _____

32. Quantas consultas pré-natal realizou? _____

33. Recebeu o diagnóstico da fissura no pré-natal? Sim Não

33.1 Em caso afirmativo em que trimestre: 1º trimestre ; 2º trimestre ; 3º trimestre

34. Suplementação na gestação:

34.1 Sem suplementação ; 2. Ácido fólico ; 3. Sulfato Ferroso 4. Outro tipo 5. Não sabe informar .

34.2 Se respondeu outro tipo, quais (qual)? _____

34.3 Quantidade diária: _____

34.4 Trimestre da gravidez em que usou suplementação:

34.5 1. 1º Trimestre ; 2. 2º Trimestre ; 3. 3º Trimestre 4. Não se aplica .

34.6 Faz uso atualmente? Sim Não

EXPOSIÇÃO A FATORES DE RISCO

TABAGISMO

35. Sobre o hábito de fumar:

Nunca fumou Fumante no período de um ano antes da gestação Fumante no primeiro trimestre da gestação Parou de fumar ao descobrir a gravidez semana gestacional: _

36. Se fumou a duração da exposição foi:

Maior que 10 anos Menor que 10 anos

37. Conviveu durante a gestação com fumante:

Sim Não

38. O pai da criança:

Nunca fumou Fumante no período de um ano antes da gestação Fumante no primeiro trimestre da gestação Parou de fumar ao ser informado da gravidez semana gestacional:

ÁLCOOL

39. Durante a gestação a exposição ao álcool esteve:

Ausente Presente no ano prévio a gestação Presente no primeiro trimestre de gestação

Parou de Ingerir álcool ao descobrir a gravidez semana gestacional: _____

40. Fez uso de álcool durante quanto tempo? _____

41. Quantidade diária de ingestão: _____

DROGAS

42. Fez uso de drogas: 1. Sim ; 2. Não .

A utilização ocorreu no primeiro trimestre de gestação 1. Sim ; 2. Não .

Qual (is)? _____

Quantidade: _____

Tempo de utilização: _____

AGENTES ABORTIVOS

43. Após descobrir que estava grávida, fez uso de algum medicamento, chá, erva ou procedimento para interromper a gestação: Sim Não

Em caso afirmativo, qual (is)? _____

PROBLEMAS MÉDICOS APRESENTADOS DURANTE A GESTAÇÃO

44. Apresentou algum problema médico durante a gestação? 1. Sim ; 2. Não .

Qual (is)? 1. Diabetes ; 2. Pressão alta ; 3. Infecção urinária ; 4. Problemas neurológicos ; 6. Outros

Quais? _____

45. Tem histórico de câncer na família? 1. Sim ; 2. Não ; 3. Não sabe informar .

45.1 Grau de parentesco: _____

45.2 Qual tipo? _____

46. Tipo da fissura da criança:

47. Histórico familiar de fissurados: 1. Positivo ; 2. Negativo .

47.1 Grau de parentesco em relação a criança:

Materno _____

Tipo de fissura: _____

Paterno _____

Tipo de fissura: _____

48. Alterações sistêmicas associadas à fissura? 1. Sim ; 2. Não .

48.1 Cardiovascular: . Qual tipo? _____

48.2 Pulmonar: . Qual tipo? _____

48.3 Otorrinolaringológica: . Qual tipo? _____

48.4 Gastrointestinal: . Qual tipo? _____

48.5 Anexos cutâneos: . Qual tipo? _____

48.6 Neurológica: . Qual tipo? _____

48.7 Outros: . Qual tipo? _____

OBSERVAÇÕES:

ANEXO A

PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA
(CEP-HULW)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da influência de fatores genéticos na ocorrência de fendas orofaciais não sindrômicas

Pesquisador: Vanessa de Melo Cavalcanti

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 49197515.2.0000.5183

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.309.490

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela mestrandia Vanessa de Melo Cavalcanti, sob orientação da Profa. Dra. Darlene Camati Persuhn. A amostra será constituída por 50 famílias (pai, mãe e criança com até 5 anos) atendidas no Serviço de Fissurados do Hospital Universitário Lauro Wanderley e pelo grupo controle (duplas mãe/filho não afetadas). A coleta de material será realizada através de bochecho com solução de sacarose e posterior extração do DNA cromossomal dos indivíduos. As mães responderão um questionário sobre os hábitos alimentares e outros fatores de risco relevantes. O isolamento do DNA cromossomal a partir de células de mucosa oral assim como os experimentos de análise molecular serão conduzidos nos laboratórios do Departamento de Biologia Molecular, de Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPB e no Departamento de Diagnóstico Oral, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, sob os cuidados da equipe do Prof. Dr. Ricardo Della Coletta.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar em trios pai/mãe/criança afetada o possível papel de polimorfismos de genes envolvidos no processo inflamatório/estresse oxidativo na ocorrência de FL/P.

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

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br

Vanessa
 Profa. Dra. Estelene Moreira Freire
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa
 HULW - EBSERN | 04/04



Continuação do Parecer: 1.309.490

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Como o procedimento de coleta de amostras biológicas é não invasivo e não oferece qualquer dano ao paciente, os riscos estão relacionados ao sigilo dos dados que será garantido.

Benefícios:

O tema ainda não foi explorado na literatura e pode auxiliar a desvendar os mecanismos biológicos envolvidos no risco de prole portadora de fissuras. A partir destes dados, novas perspectivas de prevenção podem ser sugeridas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As recomendações feitas na primeira apreciação foram atendidas e o projeto está adequado no tocante aos aspectos éticos e metodológicos, conforme diretrizes da Resolução 466/2012 do CNS/MS, não havendo mais pendências e/ou inadequações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados adequadamente, possibilitando avaliação dos aspectos éticos e metodológicos da pesquisa.

Recomendações:

Recomenda-se que a pesquisadora responsável e demais colaboradores, CUMPRAM, EM TODAS AS FASES DO ESTUDO, A METODOLOGIA PROPOSTA E APROVADA PELO CEP-HULW. Caso ocorram intercorrências durante ou após o desenvolvimento da pesquisa, a exemplo de alteração de título, mudança de local da pesquisa, população envolvida, entre outras, o pesquisador responsável deverá solicitar a este CEP, via Plataforma Brasil, aprovação de tais alterações, ou buscar devidas orientações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora atendeu às solicitações feitas anteriormente pelo CEP/HULW, portanto, o estudo encontra-se adequado e exequível sob os aspectos éticos e metodológicos recomendados pela Resolução 466/2012, CNS/MS. Não há pendências nem inadequações a serem notificadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO emitido pelo Colegiado do CEP/HULW em Reunião Ordinária realizada no dia 27 de outubro de 2015. Ressaltamos que, antes de iniciar a pesquisa, o pesquisador responsável deverá comparecer ao CEP, para receber o PARECER DE APROVAÇÃO do projeto.

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

[Assinatura]
 Vio Elvira Moreira Freire
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa
 HULW - EBSERH / UFPB



Continuação do Parecer: 1.309.490

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES

- . O participante da pesquisa deverá receber uma via do Termo de Consentimento na íntegra, com assinaturas do pesquisador responsável e do participante e/ou do responsável legal.
- . Se o TCLE contiver mais de uma folha, todas devem ser rubricadas e apor assinatura na última folha.
- . O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer dano ou prejuízo à assistência que esteja recebendo.
- . 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.
- . Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP/HULW de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- . 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.

Ao término do estudo, o pesquisador deverá apresentar Relatório final ao CEP/HULW, via Plataforma Brasil, em no máximo 30 dias, para emissão da Certidão Definitiva por este CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_PROJETO_560128.pdf	16/10/2015 08:49:22		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_AO_CEP_HULW_ASSINADO.pdf	16/10/2015 08:41:11	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Outros	CARTA_DE_ANUENCIA_DBM.pdf	16/10/2015 08:39:08	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	Anexo_2_Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_Responsavel.pdf	16/10/2015 08:21:38	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito

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

Vanessa de Melo Cavalcanti
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa
 HULW - EBSERN / UFPB
 03 de 04



Continuação do Parecer: 1.309.490

Justificativa de Ausência	Anexo_2_Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_Responsavel.pdf	16/10/2015 08:21:38	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo_1_Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_Pai_Mae.pdf	16/10/2015 08:20:15	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_GENES_ESTRESSE_OXIDATIVO_Vanessa_Cavalcanti_apos_correcao_CEP.doc	16/10/2015 08:19:42	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	14/09/2015 16:19:58	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Outros	GEP assinado.pdf	07/08/2015 16:58:05		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto Plataforma.pdf	07/08/2015 16:56:51		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 05 de Novembro de 2015

Assinado por:
MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE

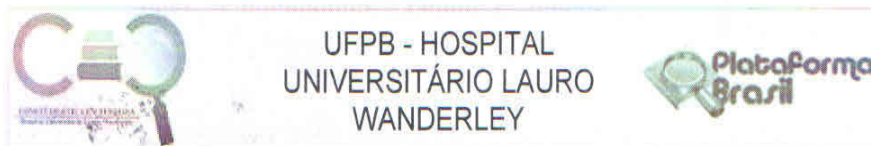
(Coordenadora)
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
HULW - EBSERH / UFPB

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

ANEXO B

NOVO PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE
ÉTICA

(CEP-HULW)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise da influência de fatores genéticos na ocorrência de fendas orofaciais não síndrômicas

Pesquisador: Vanessa de Melo Cavalcanti

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 4

CAAE: 49197515.2.0000.5183

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.865.600

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma EMENDA_1 (VERSÃO 3) de um protocolo de pesquisa intitulado 'Análise da influência de fatores genéticos na ocorrência de fendas orofaciais não síndrômicas', apresentado por Vanessa de Melo Cavalcanti, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, sob orientação da Profa. Dra. Darlene Camati Persuhn. O protocolo inicial foi aprovado por meio de Parecer nº 1309490, em 27/10/2015. A presente Emenda tem como finalidade também informar que haverá um recorte do estudo para o PIBIC, a ser desenvolvido pela aluna Clara Soeiro Maas. Metodologia do Estudo: A pesquisadora pretende fazer um estudo tipo caso-controle, em que serão incluídas 100 crianças cujas famílias tenham procurado o Serviço de Fissurados do Hospital Universitário Lauro Wanderley. Participarão crianças de 0 a 5 anos que sejam portadoras de fenda labial e/ou palatina independente de já ter sido submetida a cirurgia de correção. Para participar, será necessário coletar material biológico da criança e ambos os genitores, sendo assim, somente serão incluídas crianças que estejam acompanhadas destes. Além das novas amostras, serão incluídas no projeto amostras previamente coletadas no projeto "Análise da influência de polimorfismos da MTHFR paralelamente a variáveis ambientais como fator de risco para fendas orofaciais em crianças de até

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

[Assinatura]
 Flávia Moreira Brito
 Coordenadora do
 Comitê de Ética em Pesquisa
 - CEP - UFPB



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY



Continuação do Parecer: 1.865.600

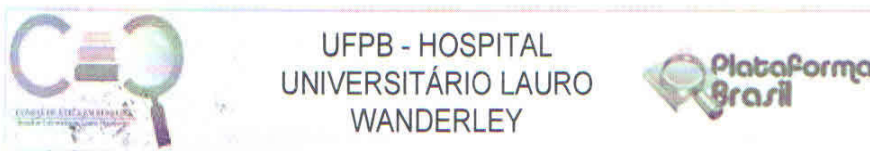
5 anos atendidas em serviço de referência do Estado da Paraíba", CAAE: 31074114.6.0000.5183, aprovado pelo CEP/HULW EM 15/12/2014, desenvolvido anteriormente pelo mesmo grupo cujas amostras de DNA e dados clínicos estão devidamente armazenados, incluindo amostras do Grupo Controle, contendo crianças não portadoras de fissuras. Os participantes da pesquisa citada assinaram termo de consentimento que informava que suas amostras poderiam ser utilizadas em outros projetos com fins científicos respeitando os critérios éticos de beneficência, sigilo e anonimato. Utilizaremos a abordagem de caso controle para comparar as frequências alélicas e distribuição genotípica

de crianças e genitoras através do teste T, buscando dessa forma identificar potenciais polimorfismos envolvidos na etiologia das fendas. A confirmação será realizada pelo teste TDT (transmission/disequilibrium test) que é um teste de associação estatística baseada em dados familiares. Para tanto, é imprescindível o dado genético do afetado e seus genitores.

Com base em dados coletados em projeto anterior, o fluxo de crianças de até 5 anos que frequentam o ambulatório de fissurados do Setor de referência, situado no HULW acompanhada por ambos os genitores é de 1 por semana em média. Diante da complexidade de obter uma amostra retrospectiva com trios completos, por motivos como: dificuldade do genitores (pais) de faltar o dia de trabalho para comparecer à consulta; crianças já cadastradas em geral já realizaram o procedimento cirúrgico e vêm acompanhadas de somente um parente, não necessariamente genitor; boa parte das famílias residem no interior do Estado, dificultando ainda mais todos os aspectos citados; a estratégia assumida neste projeto é de incluir pacientes novos, sem obviamente descartar famílias que venham com trio completo para acompanhamento. Sendo assim, estima-se obter 50 trios no período de 12 meses.

Conforme Ilk et al (2011), com 50 trios, será possível obter uma sensibilidade de 99,8% para SNPs de alta associação, 46,7% para SNPs de moderada associação e 100% para SNPs sem associação. Utilizando o TDT clássico estes percentuais seriam de 77,8%, 12% e 100% respectivamente, com o mesmo número de amostras (=50 trios). Diante destas estimativas, utilizando SNPs em genes relacionados ao estresse oxidativo, cuja relação com outras condições clínicas relacionadas ao desenvolvimento já tenham sido identificadas, cuja frequência do alelo raro não seja inferior a 0,25, espera-se obter resultados conclusivos com este número experimental. As novas amostras de células bucais serão coletadas através de um bochecho, por 60 s, de 5 ml de solução de sacarose a 3%. O conteúdo resultante do bochecho será transferido para um tubo de 15 ml, contendo previamente o volume de 5 ml de uma solução 66% alcoólica contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl e 7mM EDTA. Para as crianças que não

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



Continuação do Parecer: 1.865.600

conseguirem bochechar e cuspir ou por serem incapaz de realizar esse procedimento pela idade o procedimento de coleta poderá ser realizado esfregando suavemente uma colher de plástico (para crianças maiores de 1 ano) ou gaze estéril (para bebês) na mucosa oral da criança. Este procedimento já foi previamente validado no laboratório e a eficiência de obtenção de material biológico é satisfatória. Análise estatística

O equilíbrio de Hardy-Weinberg será calculado, e a distribuição genotípica e proporções alélicas comparadas por teste do Qui-quadrado. A metodologia SPRT (sequential probability ratio test) descrita por Ilk et al (2011) será utilizada para avaliar se houve transferência preferencial do alelo raro de pais para filhos afetados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral do projeto primário:

Analisar em trios pai/mãe/criança afetada o possível papel de polimorfismos de genes envolvidos no processo inflamatório/estresse oxidativo na ocorrência de FL/P.

Objetivo geral apresentado na Emenda(1)

Analisar em trios pai/mãe/criança afetada e mães/crianças saudáveis o possível papel de polimorfismos de genes envolvidos no processo inflamatório/estresse oxidativo na ocorrência de FL/P através de abordagem TDT ou caso controle.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como o procedimento de coleta de amostras biológicas é não invasivo e não oferece qualquer dano ao paciente, os riscos estão relacionados a exposição dos dados, no entanto o pesquisador se compromete a preservar a identidade dos participantes e sigilo dos dados coletados.

Benefícios:

O tema ainda não foi explorado na literatura e pode auxiliar a desvendar os mecanismos biológicos envolvidos no risco de prole portadora de fissuras. A partir destes dados, novas perspectivas de prevenção podem ser sugeridas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo de relevância científica e epidemiológica com possibilidades de incremento do conhecimento acerca da ocorrência da fenda lábio/palatina. A solicitação de alteração no

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

Ilaine Moreira Freire
 Coordenadora
 do Comitê de Pesquisa
 FIBSERV UFPB



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY



Continuação do Parecer: 1.865.600

protocolo de pesquisa aprovado anteriormente por esse colegiado, encontra-se adequadamente instruído no que se refere aos aspectos éticos e metodológicos, conforme diretrizes constantes 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:

Recomenda-se que o pesquisador responsável e demais colaboradores, CUMPRAM, EM TODAS AS FASES DO ESTUDO, A METODOLOGIA PROPOSTA E APROVADA PELO CEP-HULW. Caso ocorram intercorrências durante ou após o desenvolvimento da pesquisa, a exemplo de alteração de título, mudança de local da pesquisa, população envolvida, entre outras, o pesquisador responsável deverá solicitar a este CEP, via Plataforma Brasil, aprovação de tais alterações, ou buscar devidas orientações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que a emenda apresentada encontra-se adequada ao protocolo de pesquisa no tocante aos aspectos éticos e metodológicos, conforme diretrizes contidas na Resolução 466/2012 do CNS/MS, somos de parecer favorável ao seu desenvolvimento.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer APROVADO da Emenda1, emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em Reunião Ordinária, realizada em 13 de dezembro de 2016.

Ressaltamos que, antes de iniciar a pesquisa, o pesquisador responsável deverá comparecer a este CEP, para receber o PARECER CONSUBSTANCIADO DE APROVAÇÃO do projeto.

OBSERVAÇÕES IMPORTANTES

- . O participante da pesquisa deverá receber uma via do Termo de Consentimento na íntegra, com assinaturas do pesquisador responsável e do participante e/ou do responsável legal. Se o TCLE contiver mais de uma folha, todas devem ser rubricadas e apor assinatura na última folha.
- . O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer dano ou prejuízo à assistência que esteja recebendo.
- . 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

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



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY



Continuação do Parecer: 1.865.600

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.

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

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.

Ao término do estudo, o pesquisador deverá apresentar, online via Plataforma Brasil, através de Notificação, o Relatório final ao CEP/HULW para emissão 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_621400 E1.pdf	18/11/2016 14:25:40		Aceito
Outros	Carta_Resposta_CEP_HULW_Novembro.pdf	18/11/2016 14:22:07	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Outros	Responsabilidade_Financeira.pdf	18/11/2016 14:20:43	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Outros	CARTA_DE_ANUENCIA_FINANCEIRA.pdf	18/11/2016 14:19:57	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Outros	Anuencia_Orientadora.pdf	18/11/2016 14:18:55	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Outros	Anuencia_Departamento.pdf	18/11/2016 14:18:24	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_EMENDA_NOVEMBRO_2016.doc	18/11/2016 14:17:15	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Cronograma	Cronograma_Atualizado.pdf	18/11/2016 14:16:25	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Orçamento	Orçamento_detalhado_Atualizado.pdf	18/11/2016 14:15:07	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Plataforma_Atualizada.pdf	18/11/2016 14:12:16	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito

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

Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900

UF: PB Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7964 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br

Dr. Etiane Moreira Freire
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
HULW - EBSERH / UFPB



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY



Continuação do Parecer: 1.865.600

Outros	EMENDA_OUTUBRO_2016.doc	14/10/2016 13:11:09	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_AO_CEP_HULW_ASSINADO.pdf	16/10/2015 08:41:11	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Outros	CARTA_DE_ANUENCIA_DBM.pdf	16/10/2015 08:39:08	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo_2_Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_Responsavel.pdf	16/10/2015 08:21:38	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo_1_Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_Pai_Mae.pdf	16/10/2015 08:20:15	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_GENES_ESTRESSE_OXIDATIVO_Vanessa_Cavalcanti_apos_correcao_CEP.doc	16/10/2015 08:19:42	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	14/09/2015 16:19:58	Vanessa de Melo Cavalcanti	Aceito
Outros	GEP assinado.pdf	07/08/2015 16:58:05		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 13 de Dezembro de 2016

Assinado por:

MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE

Coordenadora

Comitê de Ética em Pesquisa
HULW - EBSERH

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

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7964

Fax: (83)3216-7522

E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br