**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS**

LILIA MARIA VON KOSTRISCH

**Contribuição dos polimorfismos rs10830963 e rs1387153 no gene
da melatonina para ocorrência de diabetes mellitus gestacional e
fissuras labiopalatinas**

**BAURU
2016**

LILIA MARIA VON KOSTRISCH

Contribuição dos polimorfismos rs10830963 e rs1387153 no gene da melatonina para ocorrência de diabetes mellitus gestacional e fissuras labiopalatinas

Tese apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação.

Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Orientadora: Profa. Dra. Ivy Kiemle Trindade Suedam.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

**BAURU
2016**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS**

Rua Sílvio Marchione, 3-20

Caixa Postal: 1501

17012-900 – Bauru – SP – Brasil

Telefone: (14) 3235-8000

Prof. Dr. Marco Antonio Zago– Reitor da USP

Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado – Superintendente do
HRAC-USP

Autorizo, exclusivamente, para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta Tese.

Lilia Maria von Kostrisch

Bauru, 21 de novembro de 2016.

K846c Kostrisch, Lilia Maria von
Contribuição dos polimorfismos rs10830963 e
rs1387153 no gene da melatonina para ocorrência de
diabetes mellitus gestacional e fissuras labiopalatinas /
Lilia Maria von Kostrisch. Bauru, 2016.

86 p.; il.; 30 cm.

Tese (Doutorado –Fissuras Orofaciais e Anomalias
Relacionadas) – Hospital de Reabilitação de Anomalias
Craniofaciais, Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Ivy Kiemle Trindade
Suedam

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

1. Fissura palatina. 2. Diabetes gestacional. 3.
Melatonina. 4. Polimorfismo genético.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lilia Maria von Kostrisch

Tese apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação. Área de Concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Aprovado em: ____/____/2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, FOB-USP

Profa. Dra. Ivy Kiemle Trindade Suedam - Orientadora

Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, FOB-USP

Profa. Dra. Daniela Gamba Garib Carreira

Presidente da Comissão de Pós-Graduação, HRAC-USP

Data de depósito da dissertação junto à SPG: ____/____/2016

DEDICATÓRIA

Ao **Senhor** que sempre me ajudou e me conduziu com seu braço FORTE. A Ele sejam dada toda honra e toda Glória. Todo meu agradecimento e reconhecimento do seu Poder e seu Amor.

Aos meus avós maternos **Edson** e **Janusa** e paternos **José** e **Luzia** de quem recebi a importância da honestidade e vontade de enfrentar sejam quais fossem os desafios. Eles sem dúvida foram os responsáveis por todo o começo.

Aos meus pais **Luiz** e **Ednusa** que não mediram esforços para viabilizar o que fosse necessário para a minha formação. Vocês foram meu porto mais que seguro durante todo o tempo.

Aos meus filhos **Catarina**, **Jorge Luis** e **Débora**: ao ter vocês me tornei forte. Na companhia de vocês me tranquilizei. Nos sorrisos de vocês encontrei minha felicidade.

Aos pequeninos **Vitor Sedov Cardoso von Kostrisch** e **Antônio Lucas Uchoa Sales** que vieram ao mundo para tornar meus dias muito mais coloridos e alegres.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profa. Dra. Ivy Kiemle Trindade Suedam**, Professora Associada do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), pela orientação, apoio e compreensão que foram imprescindíveis durante todo o processo de elaboração desse estudo.

Ao **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos** coorientador desse trabalho, vice-reitor da FOB e Professor Titular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), grande incentivador e colaborador das pesquisas, a minha admiração e respeito.

Ao **Prof. Dr. Alceu Sérgio Trindade Júnior**, meu orientador no Mestrado, de quem muito aprendi no início da vida acadêmica. Seus ensinamentos levarei para toda a vida.

A **Profa. Dra. Inge Ely Kiemle Trindade**, minha primeira orientadora de doutorado, que por ter uma visão muito clara e honesta, me conduziu para pessoas certas no momento certo. Muito obrigada!

Ao **Prof. José Roberto Pereira Lauris** pela pronta disponibilidade e tratamento estatístico desse estudo.

Ao endocrinologista **Dr. Carlos Antonio Negrato** pela ajuda desde o início quando cheguei a Bauru.

A todos do Laboratório de Farmacologia e Genética da FOB-USP, nas pessoas do **Dr. Thiago José Dionísio**, **Viviane Parisi dos Santos** e **Dra. Elza Araújo Torres** o meu agradecimento de coração pela monitoria, ajuda e colaboração preciosa nesse trabalho.

Ao Endocrinologista **Dr. Ieso Braz Saggioro** que tão gentilmente cedeu suas pacientes para que fosse possível a realização desse trabalho.

A Secretária **Nivalda Rodrigues Sevilha** ser humano ímpar, que recebe a todos com tanta presteza e humanidade no Posto de Saúde Central de Bauru (Postão), como sou grata a sua preciosa ajuda!

Aos meus **grandes amigos**, que não são poucos, é dispensável qualquer comentário, pois todos os elogios do mundo não traduziriam o tamanho do amor e a importância da amizade.

A todos que fazem o **HRAC-USP** e a **Maternidade Santa Isabel** onde foi possível coletar a amostra desse trabalho, o meu agradecimento pela ajuda de todos os funcionários que tive o prazer de conviver durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Daniela Gamba Garib Carreira**, Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC-USP e coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, área de concentração: fissuras orofaciais e anomalias relacionadas pelo constante incentivo na pesquisa e publicações, dando o apoio necessário aos discentes do programa.

As Secretárias da Pós-Graduação do HRAC-USP, **Maria José Bento Lopes** e **Tatiana Casoto** pela dedicação e presteza em nos servir sempre!

A toda minha **família materna** e **paterna** representada por tios e primos, impossível de enumerar a importância de todos em minha vida. Sintam-se homenageados, esse trabalho contou com a força de vocês.

A todas as **mulheres** que contribuíram com essa pesquisa, bem como as **crianças**, que doaram sua saliva para obtenção dos resultados desse trabalho, o meu eterno agradecimento.

Aos meus amados **amigos de Bauru**, porque certamente sou mais rica com a presença de vocês hoje no meu coração e infinitamente mais alegre, em ter a certeza que posso contar em qualquer circunstância. Eu encontrei esse tesouro na terra!

As fonoaudiólogas **Dra. Renata Paciello Yamashita** e **Dra. Ana Paula Fukushima**, que coordenam o laboratório de Fisiologia do HRAC-USP onde se desenvolveu parte dessa pesquisa, o meu sincero agradecimento.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro que viabilizou a realização da presente pesquisa. (Auxílio à pesquisa 2014/05388-0).

“Com grande alegria eu me rejubilarei no Senhor e meu coração exultará eternamente de alegria, porque me revestiu de fortaleza e me conduziu até aqui”.

(Is, 61,10)

RESUMO

Kostrisch LMV. Contribuição dos polimorfismos rs10830963 e rs1387153 no gene da melatonina para ocorrência de diabetes mellitus gestacional e fissuras labiopalatinas [tese]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2016.

Objetivos: o diabetes mellitus gestacional (DMG) é considerado fator etiológico de diversas anomalias congênitas, incluindo as fissuras labiopalatinas (FLP). A produção de insulina, deficiente no DMG, é regulada para menos, no período noturno, pela melatonina, hormônio indutor do sono nos seres humanos. Especula-se que polimorfismos no gene que codifica o receptor 1B da melatonina levam a uma superprodução desses receptores e a uma produção menor ainda de insulina, desencadeando o diabetes mellitus. Frente a estas informações, o objetivo do presente estudo foi investigar a prevalência dos polimorfismos rs10830963 e rs1387153 no gene que codifica o receptor 1B da melatonina em mães, com e sem DMG, e em seus filhos com e sem FLP. Buscou-se, também, determinar a associação entre a ocorrência do DMG e das FLPs e o uso de drogas lícitas e ilícitas, de medicamentos ingeridos durante a gestação, a presença de doenças sistêmicas e hipertensão arterial na gestação.

Método: estudo do tipo caso-controle, composto por 200 mulheres e seus 200 filhos, divididos em quatro grupos: G1 (50 mães sem DMG e seus 50 filhos sem FLP), G2 (50 mães sem DMG e seus 50 filhos com FLP), G3 (50 mães com DMG e seus 50 filhos sem FLP) e G4 (50 mães com DMG e seus 50 filhos com FLP). Foram coletadas as amostras de saliva da mãe e do filho(a) para extração do DNA e genotipagem. Foram considerados como genes mutados os pares de base que continham os alelos de risco G e T para o polimorfismo rs10830963 e rs1387153, respectivamente. Para fins de comparação das frequências genotípicas observadas na presente amostra com as esperadas da população mundial, utilizou-se os dados contidos no site <http://www.ensembl.org/index.html>. Dados demográficos e de saúde gestacional tais como uso de drogas lícitas e ilícitas, uso de medicamentos com potencial teratogênico, presença de doenças sistêmicas, com ênfase para hipertensão arterial, foram coletados por meio de entrevista. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

Resultados: as porcentagens encontradas do polimorfismo rs10830963 em mães com DMG, 64% (G3) e 47% (G4), foram maiores do que as encontradas na população geral (43%) e nos grupos de mães sem DMG. Estes resultados, contudo, não foram considerados significantes. Ao se agrupar as mães sem DMG (G1+G2) e compararmos com as mães com DMG (G3+G4), observou-se que a prevalência do rs10830963 foi significativamente maior no segundo grupo (OR:2,08 / CI:1,18-3,66). Já, para o rs1387153, uma prevalência estatisticamente similar foi observada nos grupos de mães com e sem DMG e em relação às encontradas na população geral (OR:1,00 / CI:0,57-1,74). Detectou-se associação entre presença do DMG e hipertensão arterial, e, DMG e idade materna. Não se observou associação entre a DMG e demais variáveis. Da mesma forma, não se detectou associação entre FLP e qualquer uma das variáveis estudadas. **Conclusões:** o principal achado do presente estudo indica que a prevalência do polimorfismo rs10830963, na amostra estudada, é maior no grupo de mães diabéticas, o que confirma a hipótese inicial desta investigação. Este fato, contudo, parece não ter sido determinante para a ocorrência, em seus filhos, das fissuras labiopalatinas.

Palavras-chave: Diabetes gestacional. Fissura palatina. Melatonina. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Kostrisch LMV. Polymorphism rs10830963 and rs1387153 contribution of the melatonin gene for the occurrence of GDM and cleft lip and [thesis].Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies,University of SãoPaulo; 2016.

Objectives: gestational diabetes mellitus (GDM) is considered one of the etiologic factors of several congenital anomalies, including cleft lip and palate (CLP). Insulin production, deficient in DMG, is down regulated at night by melatonin, hormone that induces sleep in humans. It is speculated that polymorphisms in the gene encoding the melatonin 1B receptor lead to overproduction of these receptors and to a lower production of insulin, triggering diabetes mellitus. The aim of the present study was to investigate the prevalence of polymorphisms rs10830963 and rs1387153 in the gene coding for melatonin 1B receptor, in mothers with and without DMG and in their offspring, with and without CLP. The association between the occurrence of GDM and CLP and the use of licit and illicit drugs, drugs ingested during pregnancy, the presence of systemic diseases and arterial hypertension during pregnancy was also determined. **Method:** a case-control study of 200 women and their 200 children divided into four groups: G1 (50 mothers without GDM and 50 children without CLP), G2 (50 mothers without GDM and 50 children with CLP), G3 (50 mothers with DMG and their 50 children without CLP) and G4 (50 mothers with GDM and their 50 children with CLP). Samples of the saliva of the mother and the child were collected for DNA extraction and genotyping. The base pairs containing the G and T risk alleles for polymorphism rs10830963 and rs1387153, respectively, were considered as mutated genes. For the comparison of the genotypic frequencies observed in the present sample with those expected from the world population, the data contained at <http://www.ensembl.org/index.html> were used. Demographic and gestational health data such as the use of licit and illicit drugs, the use of drugs with teratogenic potential, and the presence of systemic diseases, with an emphasis on arterial hypertension, were collected through interviews. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant. **Results:** the percentage of polymorphism rs10830963 observed in mothers with DMG, 64% (G3) and 47% (G4), were higher than those observed in the general population (43%) and in groups of mothers without DMG. These results, however, were not considered significant. When the mothers without DMG (G1+G2) and with (G3+G4) were grouped and compared, it was observed that the prevalence of rs10830963 was significantly higher in the second group (OR: 2.08 / CI: 1.18 -3.66). On the other hand, a statistically similar prevalence was observed for rs1387153 in the groups of mothers with and without DMG and in relation to those found in the general population (OR: 1.00 / CI: 0.57-1.74). An association between the presence of DMG and hypertension and between DMG and maternal age was detected. No association between GDM and other variables was observed. Likewise, there was no association between CLP and any of the studied variables. **Conclusion:** the main finding of the present study indicates that the prevalence of polymorphism rs10830963 in the sample studied is higher in the group of diabetic mothers, which confirms the initial hypothesis of the present investigation. This fact, however, does not seem to determine the occurrence of CLP their offspring.

Keywords: Gestational diabetes. Cleft palate. Melatonin. Polymorphism, Genetic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 -	Classificação das fissuras adotada pelo HRAC-USP	20
Figura 2 -	Tipos de fissuras	21

- QUADROS

Quadro 1 -	Caracterização da amostra	38
Quadro 2 -	Dados de saúde gestacional investigados	39
Quadro 3 -	Composição de reagentes para uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genótipos	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados demográficos relativos às mães (idade durante a gestação e etnia) e aos filhos (tipos de fissura), e presença de diabetes mellitus gestacional, hipertensão arterial sistêmica, medicamentos com potencial teratogênico, presença de doenças sistêmicas e uso de drogas lícitas e ilícitas pelas mães.....	48
Tabela 2 -	Prevalência dos polimorfismos rs10830963 em mães com e sem diabetes mellitus gestacional.....	50
Tabela 3 -	Prevalência dos polimorfismos rs10830963 em filhos com e sem fissuras labiopalatinas	50
Tabela 4 -	Comparação da frequência de ocorrência do polimorfismo rs10830963 entre os grupos de mães com e sem diabetes mellitus gestacional.....	50
Tabela 5 -	Prevalência dos polimorfismos rs1387153 em mães com e sem diabetes mellitus gestacional	52
Tabela 6 -	Prevalência do polimorfismo rs1387153 em filhos com e sem fissuras labiopalatinas	52
Tabela 7 -	Comparação da frequência de ocorrência do polimorfismo rs1387153 entre os grupos de mães com e sem diabetes mellitus gestacional.....	52
Tabela 8 -	Associação entre o diabetes mellitus gestacional e as variáveis drogas lícitas e ilícitas, medicamentos com potencial teratogênico, doenças sistêmicas, hipertensão arterial sistêmica.	54
Tabela 9 -	Associação entre as fissuras labiopalatinas e as variáveis drogas lícitas e ilícitas, medicamentos com potencial teratogênico, doenças sistêmicas, hipertensão arterial sistêmica.	54
Tabela 10 -	Comparação da idade materna entre os grupos de mães com e sem diabetes mellitus gestacional.....	55
Tabela 11 -	Comparação da idade materna entre os grupos de filhos com e sem fissuras labiopalatinas	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADRB3	Receptor β 3-adrenérgico
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECLAMC	Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformação Congênita
FEBRASGO	Federação Brasileira de Associações de Ginecologia e Obstetrícia
FL	Fissura de lábio
FLP	Fissuras labiopalatinas
FP	Fissura de palato
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HAPO	Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes
HbA 1c	Hemoglobina glicosilada
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
IGF2	Fator de crescimento semelhante à insulina 2
IMC	Índice de Massa Corpórea
MTNR1B	Gene que codifica o receptor 1B da melatonina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1	FISSURAS LABIOPALATINAS	17
1.2	DIABETES MELLITUS GESTACIONAL.....	22
1.3	HORMÔNIO MELATONINA E SUA RELAÇÃO COM O DIABETES MELLITUS.....	26
2	OBJETIVOS.....	31
2.1	OBJETIVO PRIMÁRIO.....	33
2.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	33
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	35
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	37
3.2	CASUÍSTICA.....	37
3.3	MÉTODO	40
3.3.1	Coleta da saliva dos pacientes	40
3.3.2	Extração de DNA a partir da saliva	40
3.3.3	Quantificação e qualificação do DNA.....	41
3.3.4	Genotipagem	41
3.4	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	43
4	RESULTADOS	45
4.1	DADOS DEMOGRÁFICOS	47
4.2	POLIMORFISMO rs10830963	49
4.3	POLIMORFISMO rs1387153	51
4.4	ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS	53
6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE.....	77
	ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

---

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 FISSURAS LABIOPALATINAS

As malformações congênitas são definidas como qualquer defeito na constituição de algum órgão ou conjunto de órgãos que determine uma anomalia morfológica estrutural presente ao nascimento por causa genética, ambiental ou mista, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (1984). As fissuras labiopalatinas (FLP) constituem um quadro clínico no qual ocorre uma interrupção anatômica dos tecidos mole, duro ou de ambos. Acometendo o complexo maxilofacial, a fissura pode envolver o lábio superior, o processo ósseo alveolar superior e o palato, individualmente ou em concomitância. É uma das malformações congênitas de maior prevalência na espécie humana. As fissuras de lábio, com o envolvimento ou não do processo alveolar e do palato, ocorrem em aproximadamente, 2:1000 indivíduos na raça amarela, 1:1000 indivíduos na raça branca e 0,3:1000 indivíduos na raça negra (GORLIN; COHEN; LEVIN, 1990). Na América Latina, estudo epidemiológico denominado ECLAMC (Estudo Colaborativo Latinoamericano de Malformações Congênitas) indica que este índice é de 0,9:1.000 (GILI et al., 2016).

O mecanismo embriológico causador de uma fissura de lábio e de palato (FLP) primário se dá entre a quinta e a oitava semana de desenvolvimento do embrião (DIEWERT, 1983; SPERBER, 1989). Exatamente nesse período, ocorre uma falha na fusão da face lateral dos processos nasais mediais com a extensão anterior dos processos maxilares de cada lado e dos processos nasais mediais entre si. Uma alteração na direção do crescimento dos processos nasais pode ser uma explicação para o estabelecimento deste tipo de fissura. Já a formação de uma fissura de palato secundário se dá entre a sétima e décima segunda semana de vida intrauterina (DIEWERT, 1983; SPERBER, 1989), podendo resultar na falha da junção das cristas palatinas por causa de uma deficiência de crescimento ou de um distúrbio no mecanismo de elevação das cristas ou mesmo a falha das cristas em se fundirem após o contato ter sido estabelecido, devido ao fato do epitélio de revestimento não se romper ou não ser reabsorvido, ou ainda a ruptura, após ter

ocorrido a fusão das cristas ou a fusão e consolidação defeituosa do mesênquima das cristas palatinas.

Segundo relatório divulgado pela Organização Mundial da Saúde (2002) a etiologia das malformações craniofaciais, incluindo as FLP, é complexa e multifatorial (SHAW; SEMB, 2007). Os fatores que podem interferir sobre o mecanismo intrínseco causando a má formação embriológica são os fatores genéticos, os ambientais e a interação de ambos (SHAW; SEMB, 2007). Em se tratando dos fatores genéticos estão incluídas as alterações de um único gene, interações poligênicas e desordens cromossômicas. Estudos clássicos publicados por Kondo et al. (2002), mostram o envolvimento dos genes TGFB, MSX1 e IRF6 com a etiologia das fissuras orofaciais. Os fatores ambientais podem exercer efeitos desfavoráveis à evolução embrionária. São citados na literatura o estado nutricional materno (hipo e hipervitaminoses), o tabagismo, consumo excessivo de álcool, o uso de drogas ilícitas durante o período gestacional, exposições ocupacionais a algumas substâncias químicas (solventes e pesticidas), exposições a raios X, doenças maternas durante a gravidez, epilepsia, infecções virais e o uso de alguns medicamentos como os benzodiazepínicos e os corticosteroides (CARMICHAEL et al., 2007; MØLGAARD -NIELSEN; HVIID, 2012; SABBAGH et al., 2016).

Com relação a origem das doenças genéticas, as consideradas multifatoriais provêm de fatores ambientais e da interação de vários genes. Pequenas variações na sequência do DNA, quando somadas, podem desencadear um fenótipo grave, como as FLP.

A manifestação clínica da fissura é variada, envolvendo lábio, palato ou ambos, com extensões e amplitudes diferentes. Segundo Spina et al. (1972) e Silva Filho e Freitas (2007), as fissuras podem ser divididas em quatro grupos conforme mostrado na Figura 1, sendo que os três primeiros grupos tomam como ponto de reparo anatômico o forame incisivo. As fissuras pré-forame incisivo (Figura 2 A e B) são assim chamadas por envolverem o lábio superior, o processo alveolar superior e o palato primário estendendo-se até o forame incisivo. São classificadas como “completa” quando envolvem as três estruturas acima citadas e “incompleta” quando envolvem apenas uma ou duas destas estruturas. Quanto à localização, podem ser unilaterais, bilaterais e medianas. As fissuras transforame incisivo são aquelas que acometem o lábio superior, o processo alveolar superior, o palato primário, passando

pelo forame incisivo e, finalmente, chegando ao palato secundário. Podem ainda ser classificadas como unilaterais (Figura 2 C e D), bilaterais (Figura 2 E e F) e medianas. Já, as fissuras pós-forame incisivo são aquelas que acometem exclusivamente o palato secundário. Podem ser divididas em completas, quando acometem toda a extensão do palato secundário envolvendo inclusive a úvula, e incompletas quando acometem parte da extensão do palato secundário não chegando até o forame incisivo. As fissuras raras da face (Figura 2 H) são fissuras desvinculadas do palato primário e secundário acometendo estruturas extra-bucais como a maxila e mandíbula.

Grupo I Fissuras pré-forame incisivo	Unilateral (direita ou esquerda)	Incompleta
		Completa
	Bilateral	Incompleta
		Completa
	Mediana	Incompleta
		Completa
Grupo II Fissuras transforame incisivo	Unilateral (direita ou esquerda)	
	Bilateral	
	Mediana	
Grupo III Fissuras pós-forame incisivo	Incompleta	
	Completa	
Grupo IV Fissuras raras da face	Fissuras desvinculadas do palato 1 ^{ario} e 2 ^{ario}	

Fissuras palato primário (Fissuras pré-forame incisivo)

Fissuras do palato primário e secundário (Fissuras transforame incisivo)

Fissuras do palato secundário (Fissuras pós-forame incisivo)

Fonte: Spina et al. (1972) modificado por Silva Filho e Freitas (2007).

Figura 1 - Classificação das fissuras adotada pelo HRAC-USP

Tipos de fissuras: Pré-forame incisivo (A e B); transforame incisivo unilateral (C e D); transforame incisivo bilateral (E e F); pós-forame incisivo (G); fissura rara da face (H).

Figura 2 - Tipos de fissuras

1.2 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

O Diabetes Mellitus (DM) é caracterizado pela concentração de glicose anormalmente elevada no plasma sanguíneo (hiperglicemia), resultante da secreção inadequada da insulina, pela diminuição da sensibilidade dos tecidos à insulina, ou de ambas (SILVERTHORN, 2010). De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (DIRETRIZES..., 2014) e a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, c2016), o DM é classificado em quatro classes:

- DM tipo 1 (DM1): resultante da destruição autoimune das células beta pancreáticas, com consequente deficiência na produção da insulina. Representa 10% dos casos de DM. Geralmente se manifesta durante a infância ou adolescência e tem início agudo;
- DM tipo 2 (DM2): caracteriza-se pela defeitos na ação e secreção da insulina. Representa 90% dos casos de DM. Geralmente diagnosticado em adultos de meia-idade e está diretamente associada à obesidade;
- DM gestacional (DMG): qualquer intolerância à glicose, de caráter temporário, com início durante a gestação;
- outros tipos específicos de DM: causados por fármacos, por defeitos genéticos nas células beta pancreáticas ou por outros motivos menos comuns.

Quanto ao DM, esta não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, que resulta em defeitos na ação da insulina, na sua secreção ou em ambas. Tem como sintomas principais a polidipsia (sensação excessiva de sede), a poliúria (aumento do volume urinário), a polifagia (sensação excessiva de fome) e a astenia. A concentração sanguínea de glicose tanto em jejum quanto pós-prandial, é determinada pelo ritmo de aparecimento desta glicose no sangue (absorção e produção hepática) e de seu desaparecimento (depuração), sendo a insulina, hormônio produzido pelas células beta das ilhotas de Langerhans, o principal responsável pela homeostase da glicose (SPILSON; KIM; CHUNG, 2001; GENUTH et al., 2003; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004).

O DMG, foco da presente investigação, é definido como qualquer grau de intolerância à glicose de magnitude variável, *primeiramente* diagnosticada durante a gravidez. O DMG associa-se tanto à resistência à insulina quanto à diminuição da função das células beta-pancreáticas (ABERG; WESTBOM; KÄLLÉN, 2001; SCHMIDT et al., 2001; SEGRE; SANTORO JUNIOR, 2002). De acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (DIRETRIZES..., 2014), esta condição acomete de 0,15% a 17,8% das gestantes. Quatro a seis semanas após o parto, as pacientes com DMG devem ser reavaliadas e reclassificadas ou como apresentando DM2 ou como revertido o quadro (normoglicemia). Na maioria dos casos, há reversão para a tolerância normal após a gravidez, porém existe a possibilidade de 10% a 63% das mulheres de desenvolver DM2 dentro de 5 a 16 anos após o parto (DIRETRIZES..., 2014).

A International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (2010) propôs um novo protocolo diagnóstico estabelecendo rastreamento universal das gestantes utilizando o teste oral de tolerância a glicose (TOTG 75g) entre 24^a e 28^a semanas de gestação. De acordo com esse protocolo, a glicemia materna é avaliada em três amostras de sangue (jejum, 1h e 2h após a sobrecarga de glicose) e apenas um resultado alterado aleatório durante a gestação é suficiente para o diagnóstico de DMG (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

A detecção da hiperglicemia no início da gestação, antes da 24^a semana, é de extrema importância tendo em vista que estas gestantes podem iniciar o tratamento logo que for detectada a hiperglicemia, diminuindo assim o risco de abortos espontâneos e anomalias congênitas que são complicações da hiperglicemia neste período (STARIKOV et al., 2013).

O grupo Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO), que avalia os efeitos adversos da hiperglicemia nas gestações, publicou em 2008, um estudo multinacional com aproximadamente 25 mil gestantes, concluindo que existe uma relação diretamente proporcional entre a hiperglicemia e o aparecimento de complicações perinatais durante a gestação. Além disso, este estudo evidenciou a existência de riscos para complicações perinatais em gestantes anteriormente classificadas normoglicêmicas (HAPO, 2008). Resultados similares foram encontrados em outros estudos (RAY et al., 2001; LANDON et al., 2009), indicando a necessidade da elaboração de novos critérios para o diagnóstico do DMG.

Segundo a Federação Brasileira de Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO), o rastreamento, ou screening, para o DMG deve ser universal (em todas as gestantes) e realizado através da glicemia de jejum associada a fator(es) de risco (NOVAS..., 2010). O rastreamento positivo que é glicemia de jejum ≥ 95 mg/dl e/ou presença de fatores de risco, impõe a realização de testes diagnósticos, ou seja, a realização da curva glicêmica ou teste oral de tolerância à glicose (TOTG 75g), como referido anteriormente. Os pontos de corte para os valores glicêmicos são: 95 mg/dl, 180 mg/dl e 155 mg/dl, respectivamente para jejum, uma e duas horas da sobrecarga de glicose. Uma vez confirmado o diagnóstico, ela deverá ser encaminhada para um centro de referência, com uma equipe multiprofissional especializada na assistência à gestante diabética (NOVAS..., 2010). Com a mudança nos critérios para o diagnóstico, a prevalência do diabetes gestacional deverá aumentar significativamente, principalmente porque apenas uma concentração acima dos critérios de corte resulta em confirmação do diagnóstico do DMG.

Já é consenso que a presença de diabetes mellitus em grávidas está relacionada a um aumento de 2 a 8 vezes na ocorrência de malformações e síndromes nos fetos. Acredita-se que esta associação seja devida ao efeito deletério da hiperglicemia presente na fase embrionária da gestação (MILLS, 1982; REECE; HOBBS, 1986; BECERRA et al., 1990; KITZMILLER et al., 1996; CASSON et al., 1997; GUTON et al., 2000). Estudos que avaliaram a relação entre o controle glicêmico e as malformações e síndromes, mostraram um efeito dose-resposta: quanto pior o controle glicêmico no período periconcepcional, maior o risco de defeitos congênitos e complicações gestacionais (MILLER et al., 1981; FUHRMANN et al., 1983; TOWNER et al., 1995; SUHONEN; HIILESMAA; TERAMO, 2000; WILLIAMS; MODDER, 2010; MATERNA-KIRYLUK et al., 2011).

Estudo recentemente publicado pelo grupo de pesquisa Trindade-Suedam et al. (2016) demonstrou que mulheres brasileiras com DM são mais propensas a terem filhos com FLP, quando comparadas às mulheres sem DM. A prevalência de DM na amostra analisada foi de 27%, enquanto nas populações global e brasileira esse percentual é significativamente menor, de cerca de 7%. O estudo também mostrou que o uso de drogas durante a gestação aumenta em quase três vezes o risco para a ocorrência de FLP, associadas a outras anomalias craniofaciais.

Estudos realizados em pacientes latinas apontam uma incidência nitidamente aumentada de anomalias congênitas em bebês de mulheres com DMG, que apresentaram níveis mais elevados de glicemia de jejum (JANSSEN; ROTHMAN; SCHWART, 1996; SCHAEFER et al., 1997). Filhos de tais mulheres são suscetíveis ao maior risco de sobrepeso, que se relaciona diretamente tanto com o ritmo de crescimento intrauterino, como com o índice de massa corpórea (IMC) dos pais (GARCÍA-PATTERSON et al., 2004).

Para o recém-nascido, os danos são bem piores que para a mãe, podendo levar a morte intrauterina no caso onde o DMG não foi acompanhado ou não cuidado pela mãe. As malformações fetais, macrossomias fetais, cardiopatias congênitas, síndrome da angústia respiratória, icterícia, hipoglicemia neonatal são repercussões que o conceito pode ter em decorrência do DMG e do não acompanhamento médico (REECE; HOMKO, 2000; MONTENEGRO; REZENDE FILHO, 2008). Assim sendo, o controle glicêmico da mãe, por meio de hipoglicemiantes orais e insulina, quando necessária, passa a ser um importante marcador prognóstico para o feto, podendo reduzir de maneira significativa o risco de anomalias congênitas (MENEZES et al., 1999; SCUTARIU; CIUPILAN, 2006; YAZDY et al., 2011).

Embora uma forte ligação entre hiperglicemia e anomalias congênitas já tenha sido estabelecida (REECE; HOMKO, 2000), o mecanismo preciso através dos quais se dá o desenvolvimento fetal anormal, ainda não foi completamente elucidado. Várias teorias foram postuladas, incluindo o dano do saco vitelino, estados de deficiência do ácido aracdônico ou monoinositol, liberação de radicais livres e a disrupção dos sinais de transdução. O crescimento celular, desenvolvimento e diferenciação são controlados por sinais de crescimento externos que são transmitidos da superfície das células para seu núcleo. Os lípides contidos nas membranas plasmáticas são as fontes de sinal molecular. Evidências têm se acumulado, sugerindo que as embriopatias podem estar ligadas à disrupção da sinalização intracelular por efetores derivados do inositol e precursores de prostaglandinas tais como o ácido aracdônico. Por outro lado, podem também ocorrer efeitos genotóxicos como resultado de tais alterações que podem ocorrer isoladamente ou em combinação (KOSTRISCH, 2012).

Como se vê, o diabetes mellitus tem sido descrito em vários estudos como possível fator etiológico de diversas anomalias congênitas, onde as mulheres diabéticas têm maiores chances de gerar filhos com anomalias congênitas, dentre elas as FLP (SPILSON; KIM; CHUNG, 2001). Além do o ambiente intrauterino hiperglicêmico, a associação com a suscetibilidade genética é um importante determinante da malformação fetal, dependendo do período de exposição à hiperglicemia e da intensidade da mesma (HAPO, 2002; GREENE; SOLONON, 2005; LEBBY; TAN; BROWN, 2010).

Como observado, muitas lacunas permeiam a compreensão da etiologia do DMG. Esta incompreensão começa a estimular os pesquisadores a realizarem análises moleculares, como foi o caso dessa investigação, principalmente com genes candidatos ao aparecimento do DMG, além de verificar a correlação que poderia existir entre essa predisposição em desenvolver DMG e consequentemente se encontrar malformações congênitas como as FLP na prole dessas mulheres.

1.3 HORMÔNIO MELATONINA E SUA RELAÇÃO COM O DIABETES MELLITUS

A melatonina é um hormônio que exerce papel fundamental na regulação de um importante ciclo na vida dos seres humanos: o ritmo circadiano, também conhecido como ciclo claro-escuro. A melatonina é secretada pela glândula pineal que fica localizada no cérebro e sua produção é estimulada pela ausência de luz. Quando a retina registra sinais luminosos envia as informações para o núcleo supraquiasmático que as repassa à glândula pineal, cessando a produção do hormônio (ARENDT; SKENE, 2005).

O papel da melatonina na homeostase da *glicose* tem sido foco de grande investigação. Há uma crescente evidência, sugerindo uma forte ligação entre a melatonina e a insuficiente produção de insulina. Além disso, a melatonina tem influenciado a secreção de insulina tanto *in vivo* como *in vitro* e os níveis de melatonina noturna estão relacionados com concentrações de produção de insulina noturna em pacientes com diabetes (SERAPHIM et al., 2000). Em outras palavras, a secreção de melatonina no período noturno reduz, gradativamente, a produção de

insulina, por meio de sua ligação com o receptor 1B, presente nas células betas pancreáticas, impedindo a secreção de insulina por estas células, durante o sono.

Os polimorfismos no gene do receptor 1B da melatonina fazem com que haja uma maior produção desses receptores, o que acarretará em uma maior interação entre ligante e receptor, logo, menos produção de insulina. Basicamente, este mecanismo de inibição da secreção de insulina se deve à inativação da adenilato ciclase e da formação de GMPc (monofosfato cíclico de guanosina), promovida pela interação da melatonina com o receptor 1B (MTNR1B) (MULDER et al., 2009).

Entende-se por polimorfismo genético variações na sequência de DNA em determinados locais cromossômico, que podem ocorrer em sequências codificadoras e não-codificadoras, que levam a alterações qualitativas e funcionais e/ou quantitativas de proteínas (LIMA et al., 2006). Se estas variações são encontradas em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo (BALASUBRAMANIAN et al., 2004; ROCHA et al., 2007). Alguns polimorfismos são evidentes, porque afetam o fenótipo, mas outros são considerados ocultos, pois não possuem efeito aparente (BENJAMIN, 2001). Assim, as características que o indivíduo exibe em seu fenótipo são iguais ao resultado da sua constituição genética mais a influência de fatores do meio ambiente.

Estudos recentes têm descrito o aumento da expressão do MTNR1B como sendo a causa de risco elevado para o desenvolvimento do DM2, que compartilha um fundo genético similar ao DMG (BEN-HAROUSH; YOGEV; HOD, 2004; LYSENKO et al., 2009; MULDER et al., 2009). Estes dados sugerem que a melatonina pode desempenhar um papel no aparecimento da DM e distúrbios metabólicos associados, não só por meio da regulação da secreção de insulina, mas também por proporcionar proteção contra as espécies reativas de oxigênio, tendo em conta as células beta pancreáticas, que são particularmente susceptíveis ao stress oxidativo, porque elas possuem baixa capacidade antioxidante (LARDONE et al., 2014).

Importante estudo publicado por Lyssenko et al. (2009) mostra haver forte associação entre o receptor 1B da melatonina e o DM2, em diferentes populações mundiais. Porém, apenas um estudo na população brasileira foi encontrado que

demonstra esta associação (LOBO JUNIOR et al., 2015). Esse dado nos faz investigar se na população brasileira, isso, de fato, se confirma.

A literatura tem demonstrado que dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) específicos no gene MTNR1B, quais sejam, rs10830963 e rs1387153, localizados no cromossomo 11 na região q21-q22, estão ligados ao aparecimento de DM2 e DMG (LIU et al., 2010; NAGORNY; LISSENKO, 2012; LOBO JUNIOR et al., 2015).

Autores como Rönn et al. (2009) e Huopio et al. (2013), afirmaram que os polimorfismos rs10830963 e rs1387153 do MTNR1B estão significativamente associados com DMG e com os níveis de glicemia de jejum elevados e níveis diminuídos de secreção de insulina. Além do rs10830963 e rs1387153, Zhang et al. (2013) encontraram associações significativas entre o DMG e outros polimorfismos e seus respectivos genes, sendo eles: rs7903146 (TCF7L2); rs12255372 (TCF7L2); rs1799884 (-30G/A, GCK); rs5219 (E23K, KCNJ11); rs7754840 (CDKAL1); rs4402960 (IGF2BP2) e rs1801278 (Gly972Arg, IRS1).

Liu et al. (2010), em seu estudo de caso-controle, afirmam que o alelo de risco (alelo G) de rs10830963 e (alelo T) de rs1387153 conduzem a um risco mais elevado para DMG. Xia et al. (2012) avaliaram um total de 23 estudos envolvendo 172.963 citações para os dois polimorfismos comuns (rs10830963, rs1387153) de MTNR1B. Esta meta-análise demonstrou que os dois polimorfismos são comprovadamente fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus gestacional e regulação da glicose.

Fica evidente, portanto, que nas últimas décadas, uma variedade de polimorfismos genéticos foi descrita associada aos diferentes tipos de diabetes (TANG et al., 2012; YANG et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Estes estudos necessitam ser replicados em diferentes populações, pois as frequências genótípicas e alélicas desses polimorfismos podem variar conforme a composição étnica da população estudada (GUPTA et al., 2012).

Contudo, até o presente momento, nenhum dos estudos investigou a prevalência destes SNPs nos pares “mães-filhos”, especialmente na população brasileira. Esta investigação é mandatória, pois permitirá investigar a contribuição da ancestralidade na ocorrência dos polimorfismos em questão.

Sendo assim, a hipótese deste estudo é que a prevalência dos polimorfismos rs10830963 e rs1387153 do gene receptor 1B da melatonina seja maior em mães que tiveram DMG e consequentemente geraram filhos com FLP.

2 OBJETIVOS

---

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Investigar a prevalência dos polimorfismos rs10830963 e rs1387153 no gene que codifica o receptor 1B da melatonina em mães, com e sem diabetes mellitus gestacional, e em seus filhos, com e sem fissuras labiopalatinas.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Investigar se há associação entre a ocorrência dos polimorfismos rs10830963 e rs1387153 e a DMG.
- Determinar a chance de ocorrência dos polimorfismos rs10830963 e rs1387153, no grupo de mães, com e sem DMG, e em seus filhos, com e sem FLP.
- Se há associação entre a ocorrência de DMG e o uso de drogas lícitas e ilícitas, de medicamentos ingeridos durante a gestação, a presença de doenças sistêmicas e hipertensão arterial na gestação.
- Se há associação entre a ocorrência de FLP e o uso de drogas lícitas e ilícitas, de medicamentos ingeridos durante a gestação, a presença de doenças sistêmicas e hipertensão arterial na gestação.
- Se há associação entre a ocorrência de DMG e FLP e a idade materna.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

---

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do HRAC – USP, CAAE: 27187214.3.0000.5441, Parecer n. 815454 (Anexo A). Os participantes formalizaram sua adesão por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (Anexo B), obedecendo aos preceitos da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisas envolvendo seres humanos.

3.2 CASUÍSTICA

Para o cálculo formal da amostra, adotou-se o alfa (α) 5%, poder do teste de 80%, proporção esperada de 50% e erro de 10%. Assim, determinou-se que a amostra do estudo, estudo este do tipo caso-controle, deveria ser composta por 200 indivíduos, divididos em quatro grupos, de mães e seus filhos, assim descritos: Grupo 1 (G1): 50 mães que não tiveram DMG e seus 50 filhos que não nasceram FLP; Grupo 2 (G2): 50 mães que não tiveram DMG e seus 50 filhos que nasceram com FLP; Grupo 3 (G3): 50 mães que tiveram DMG e seus 50 filhos que não nasceram com FLP; Grupo 4 (G4): 50 mães que tiveram DMG e seus 50 filhos que nasceram com FLP. Estas informações estão ilustradas no Quadro 1.

As entrevistas e coletas foram realizadas no período de março a setembro de 2015, até a completude da amostra. As coletas referentes ao G1 e G3 foram realizadas na Maternidade Santa Isabel (FAMESP) e no Posto de Saúde Central de Bauru. Já, as coletas das amostras do G2 e G4, por envolverem filhos com FLP, foram realizadas no ambulatório do HRAC-USP (Quadro 1).

Grupo	Características		Local de Recrutamento
	Mães	Filhos	
G1	Sem DMG	Sem FLP	Maternidade Santa Isabel
G2	Sem DMG	Com FLP	HRAC-USP
G3	Com DMG	Sem FLP	Maternidade Santa Isabel e Posto de Saúde Central de Bauru
G4	Com DMG	Com FLP	HRAC- USP

Quadro 1 - Caracterização da amostra

Na Maternidade Santa Isabel o diagnóstico de DMG constava no prontuário e essas mães eram tratadas como gestantes de alto risco. Os bebês eram avaliados por neonatologistas logo após o parto, facilitando a eleição ou não para o presente estudo. Da mesma forma, no Posto de Saúde Central de Bauru, o diagnóstico de DMG constava no prontuário da área de Endocrinologia. No HRAC, o diagnóstico de DMG foi auto-referido pelas mães. Ademais, confirmou-se o diagnóstico de DMG durante a entrevista frente ao relato do uso de hipoglicemiantes orais e/ou insulina durante a gestação.

Os critérios de inclusão para os grupos estudados foram mães com e sem DMG, filhos com idade de 0 a 10 anos, com e sem FLP. Foram adotados como critérios de exclusão, para as mães, a presença de DM1 ou DM2 prévia à gestação, e, para os filhos, a presença de outras anomalias craniofaciais ou síndromes associadas às FLP. Estes dados foram coletados nos prontuários dos participantes.

Após concordarem em participar da pesquisa, as mães assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B). Na sequência, foram interrogadas com uma entrevista onde se obteve dados de identificação e tópicos diretamente relacionados com DMG e FLP (Apêndice A).

O diagnóstico de DMG foi auto-referido pela mãe durante a entrevista, conforme resposta às seguintes perguntas: “A Sra. teve diabetes ou açúcar aumentado no sangue durante a gravidez?” e “Que medicamentos tomou para a diabetes gestacional?” Após resposta positiva à primeira pergunta, a mãe foi selecionada para compor os grupos com DMG. É importante ressaltar que o diagnóstico de DMG comprovado por exame não foi possível, pois se tratava de uma

condição temporária, diretamente relacionada ao período gestacional, e, nas mães avaliadas, os filhos já haviam nascido, ou seja, a gestação já havia se encerrado. Já, o diagnóstico de FLP foi realizado clinicamente e o tipo de fissura confirmada pela análise de prontuário. Crianças que possuíam síndromes associadas, evidentes clinicamente, ou relatadas no prontuário, foram excluídas do estudo.

Por meio de consulta ao prontuário, os seguintes dados demográficos de idade durante a gestação e etnia das mães foram coletados. Das crianças, foram coletados os seguintes dados: idade, gênero, tipos de fissura e presença ou não de síndromes e anomalias associadas. Ainda, foram coletados os seguintes dados de saúde gestacional: 1) presença de hipertensão arterial sistêmica, 2) uso de medicamentos sistêmicos com potencial teratogênico, 3) ocorrência de doenças sistêmicas com potencial teratogênico, 4) uso de drogas lícitas, 5) uso de drogas ilícitas, conforme ilustra o Quadro 2 e o Apêndice A.

Dados de saúde gestacional	
1. Presença de hipertensão arterial sistêmica	• Presença
	• Ausência
2. Uso de medicamentos sistêmicos com potencial teratogênico	• Anti-inflamatórios não-esteroidais
	• Corticoides
	• Antidepressivos
	• Anticonvulsivantes
3. Ocorrência de doenças sistêmicas com potencial teratogênico	• Doenças infectocontagiosas
	• Outras
4. Uso de drogas lícitas	• Tabaco
	• Álcool
5. Uso de drogas ilícitas	• Fez uso
	• Não fez uso

Quadro 2 - Dados de saúde gestacional investigados

3.3 MÉTODO

3.3.1 Coleta da saliva dos pacientes

As mães foram orientadas a depositar a saliva no tubo estéril Oragene.DNA (Oragene^{TM} DNA GenotekOG-500, Ottawa, Ontário, Canadá) e imediatamente o tubo foi fechado, onde é rompido o lacre e liberado o líquido que mantém o DNA em condições para ser avaliado. Ao entrar em contato com o líquido contido no tubo, o DNA é imediatamente estabilizado. Neste líquido conservante, as amostras ficam estáveis à temperatura ambiente durante anos, sem necessidade de qualquer processamento. As amostras podem ser armazenadas indefinidamente entre -15°C e 20°C e podem inclusive passar por sucessivos ciclos de congelamento sem deterioração do DNA.

Nas crianças, a coleta de saliva foi realizada pela pesquisadora, por meio de esfregão da mucosa jugal e alveolar, com swab, depositado em tubo Oragene.DNA. Na sequência, os tubos foram armazenados em geladeira a 4°C.

3.3.2 Extração de DNA a partir da saliva

Para a extração de DNA a partir da saliva, foi utilizado o QIAamp DNA Mini Kit (número de catálogo 51104, Qiagen®, Alemanha) conforme orientações do fabricante. Para tanto, 200 µL da saliva foram colocadas em contato com a solução de lise celular do kit, o que provocou a quebra da membrana celular e nuclear, expondo o material genético. Em seguida, essa solução foi colocada na coluna de sílica do kit, a qual retém o DNA e permite a passagem dos restos celulares. Por último, houve a eluição desse DNA com água ultra pura em um novo tubo e armazenada a 4°C.

3.3.3 Quantificação e qualificação do DNA

Essa etapa teve por objetivo quantificar e verificar a qualidade do DNA extraído. O aparelho utilizado foi o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (ThermoScientific®, USA) o qual fornece os dados de absorbância em 230, 260 e 280 nanômetros após o carregamento de 2µL de amostra sem diluição. Este aparelho emite luz nos comprimentos de onda citados acima, e ao mesmo tempo detecta quanto dessa luz foi absorvida pela amostra. No caso do DNA, há a absorção da luz no comprimento de 260 nanômetros e o cálculo utilizado para a quantificação desse DNA é: **[DNA] = Absorbância em 260 nanômetros x fator de diluição x 50 (constante para o DNA)**. De posse desses dados, o mesmo aparelho, indicou a quantidade e a qualidade do DNA o qual foi usado para estudo. A qualidade é expressa de acordo com a razão entre a absorbância em 260 nm e 280 nm (A260/A280) a qual deve estar entre 1,7 e 1,9.

3.3.4 Genotipagem

Para a discriminação dos diferentes genótipos em estudo, foi utilizado o sistema Taqman® no aparelho de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real Viia7 (AppliedBiosystems®, USA), utilizando-se ensaios produzidos e validados pela empresa AppliedBiosystems®.

Esses ensaios consistem na presença de quatro oligonucleotídeos, sendo eles: o primer Forward que vai da posição 5' para a posição 3' do DNA, o primer Reverse que vai da posição 3' para a posição 5' do DNA e as Sondas que também vão da posição 5' para a posição 3' do DNA. Os primers Forward e Reverse flanqueiam a região do DNA a qual possui o polimorfismo e foi amplificada por meio da técnica de PCR. As sondas anelarão exatamente na região do polimorfismo. A diferença é que uma delas possui as sequências de bases corretas e é marcada com o fluoróforo VIC®. A outra sonda, marcada com o fluoróforo FAM®, possui praticamente as mesmas sequências de bases, exceto uma a qual caracteriza o polimorfismo. Sendo assim, após o término do experimento tivemos a amplificação somente de fragmentos de DNA marcados com a sonda VIC, o que assinalará que o

sujeito é homozigoto ancestral para o determinado gene. Tivemos também à amplificação de fragmentos de DNA somente marcados com a sonda FAM que caracterizou o sujeito como homozigoto polimórfico e por fim houve a possibilidade da amplificação de fragmentos de DNA de ambas as sondas, o que indicou o sujeito heterozigoto.

Para a realização das reações de discriminação dos genótipos em estudo, foram utilizados os ensaios com os seguintes números de catálogo: C__3256858_10 para o rs10830963 e C__1932612_10 para o rs1387153 (ThermoFischerScientific). Além disso, amostras de DNA devidamente quantificadas e qualificadas e um reagente denominado TaqMan® Genotyping Master Mix (número de catálogo 4381656, AppliedBiosystems®, USA) o qual contém todos os reagentes necessários para a reação, dentre os quais, a taq polimerase, o cloreto de magnésio e as bases nitrogenadas, foram utilizados. No Quadro 3 é possível observar a composição da mistura de reagentes necessária para as reações de discriminação alélica. Vale destacar que todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Reagentes	Quantidade em µL para uma reação
Amostra (10ng/µL)	2 µL
TaqMan® Genotyping Master Mix	2,5 µL
Ensaio inventariado 40X	0,125 µL
Água ultra pura	0,375 µL
Volume final	5 µL

Quadro 3 - Composição de reagentes para uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genótipos

Após a confecção dos ensaios na placa de 384 poços (número de catálogo 4343370, AppliedBiosystems®, USA), essa mesma placa foi colocada no aparelho Viiia7 (AppliedBiosystems®, USA) e as seguintes condições de ciclagem foram utilizadas para a realização da PCR: temperatura inicial de 95°C por 10 minutos para a ativação da taq polimerase seguido de 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

3.4 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para comparação das frequências genótípicas entre grupos, foi utilizado o teste do *qui-quadrado* (Microsoft Excel 2010). Para fins de comparação das frequências genótípicas observadas na presente amostra com as esperadas da população mundial, utilizou-se os dados contidos no site <http://www.ensembl.org/index.html>, considerado base de dados padrão para obtenção das frequências genótípicas de diferentes populações.

Para a aferição do risco de ocorrência dos polimorfismos em mães e em seus filhos, calculou-se o odds ratio (MedCalc *easy-to-use statistical software* online - <https://www.medcalc.org/index.php>).

Para a verificação da associação entre as variáveis drogas lícitas e ilícitas, medicamentos com potencial teratogênico, doenças sistêmicas e hipertensão arterial sistêmica com diabetes mellitus gestacional (mães) e com fissuras labiopalatinas (filhos), utilizou-se o teste do Qui-quadrado.

Por fim, utilizou-se o test *t* de Student para comparação da idade materna nas mães com e sem DMG e para comparação da idade materna de mães que tiveram ou não filhos com FLP. Para todas as comparações, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

---

4 RESULTADOS

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS

Na amostra estudada, as mães apresentaram média de idade de 31 anos, eram predominantemente brancas (55%). A fissura mais prevalente nos grupos G2 e G4 foi a fissura de lábio e palato (transforame incisivo), em 60% da amostra. Com relação às doenças sistêmicas, a HAS foi observada em 25% das mães, sendo que, no G3 e G4, esta porcentagem estava significativamente aumentada, 50% e 30% das mães apresentavam HAS, respectivamente, contra 4% (G1) e 16% (G2).

Nos grupos G3 e G4, 70% e 62% das mães apresentaram outras doenças sistêmicas relevantes, tais como sífilis, toxoplasmose, dengue e hepatite, contra 58% e 56%, no G1 e G2, respectivamente. Nos grupos G3 e G4, 10% e 8% das mães utilizaram medicamentos com potencial teratogênico, contra 6% no G1 e G2. O tabagismo foi relatado por 9% do total da amostra, com ênfase para o G3, que apresentou uma porcentagem de 16%. A ingestão de bebidas alcoólicas e o uso de drogas ilícitas durante a gestação foram relatados por 5% e 1% das mães. Estes dados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados demográficos relativos às mães (idade durante a gestação e etnia) e aos filhos (tipos de fissura), e presença de diabetes mellitus gestacional, hipertensão arterial sistêmica, medicamentos com potencial teratogênico, presença de doenças sistêmicas e uso de drogas lícitas e ilícitas pelas mães

Grupo	Idade (X ± DP)	Raça	Tipo de Fissura			DMG	HAS	MED	DS	Drogas lícitas		Drogas ilícitas
			FL	FLP	FP					Tabaco	Álcool	
G1 (n=50)	26,4 ± 7,9	B=25 (50%)										
		P=18 (36%)					S=2 (4%)	S=3 (%6)	S=29 (58%)	S=5 (10%)	S=4 (8%)	S=1 (2%)
		Ne=7 (14%)	-	-	-	N	N=48 (96%)	N=47 (%94)	N=21 (42%)	N=45 (90%)	N=46 (92%)	N=49 (98%)
		A=0										
G2 (n=50)	30,2 ± 8,4	B=19 (38%)										
		P=30 (60%)	8 (16%)	30 (60%)	12 (24%)	N	S=8 (16%)	S=3 (%6)	S=28 (56%)	S=2 (4%)	S=0 (0)	S=0 (0)
		Ne=1 (2%)					N=42 (84%)	N=47 (%94)	N=22 (44%)	N=48 (96%)	N=50 (100%)	N=50 (100%)
		A=0										
G3 (n=50)	34,3 ± 6,8	B=33 (66%)										
		P=13 (26%)				S	S=25 (50%)	S=5 (10%)	S=35 (70%)	S=8 (16%)	S=3 (6%)	S=0 (0)
		Ne=4 (8%)	-	-	-		N=25 (50%)	N=45 (90%)	N=15 (30%)	N=42 (84%)	N=47 (94%)	N=50 (100%)
		A=0										
G4 (n=50)	31,7 ± 7,4	B=33 (66%)										
		P=14 (28%)				S	S=15 (30%)	S=4 (8%)	S=31 (62%)	S=3 (6%)	S=4 (8%)	S=0 (0)
		Ne=3 (6%)	6 (12%)	30 (60%)	14 (28%)		N=35 (70%)	N=46 (92%)	N=19 (38%)	N=47 (94%)	N=46 (92%)	N=50 (100%)
		A=0										
TOTAL	30,7 ± 3,3	B=55%					S=50 (25%)	S=15 (30%)	S=123 (62%)	S=18 (9%)	S=11 (5%)	S=1 (1%)
		P=37%					N=150 (75%)	N=18 (70%)	N=77 (38%)	N=182 (91%)	N=189 (95%)	N=199 (99%)
		Ne=8%	-	-	-	-						
		A=0										

X ± DP= média ± desvio padrão; FL= fissuras de lábio; FLP= fissuras labiopalatinas; FP= fissuras de palato; DMG= diabetes mellitus gestacional; HAS= hipertensão arterial sistêmica; MED= medicamento com potencial teratogênico; DS= doenças sistêmicas; G1= mães sem DMG e filhos sem FLP; G2= mães sem DMG e filhos com FLP; G3= mães com DMG e filhos sem FLP; G4= mães com DMG e filhos com FLP; B= branco; P= pardo; Ne= negro; A= amarelo; S= sim; N= não.

4.2 POLIMORFISMO rs10830963

As porcentagens encontradas do polimorfismo rs10830963 em mães com DMG (G3 e G4) foram maiores do que as encontradas na população geral. Porém, estes resultados não foram considerados significantes. Nos grupos G1 e G2, porcentagens menores do que as encontradas na população geral foram observadas, porém, estes valores não foram significantes. Ressalte-se que, no G3, a chance de ocorrência do polimorfismo rs10830963 foi duas vezes maior (OR:2,38, CI: 1,18-3,66) que na população geral. Na comparação entre os grupos, diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre as mães dos grupos G1 vs G3 e G2 vs G3. Estes resultados estão expressos na Tabela 2.

Da mesma forma que em suas mães, as porcentagens encontradas do polimorfismo rs10830963, nos filhos, foram maiores que as encontradas na população geral, para os grupos G3 e G4. Esses valores, contudo, não foram considerados estatisticamente significantes. Nos grupos G1 e G2, foram observados valores menores em comparação à porcentagem esperada na população mundial, porém não significativos (Tabela 3).

Ao agruparmos as mães sem DMG (G1+G2) e compararmos com o grupo de mães com DMG (G3+G4), foi possível observar que a prevalência do rs10830963 foi significativamente maior no segundo grupo. Observou-se, também, que a chance de ocorrência do rs10830963 foi duas vezes maior no segundo grupo (Tabela 4).

No intuito de aferir se no grupo de mães diabéticas, cujos filhos nasceram com FLP (G4), a prevalência deste polimorfismo era maior, comparou-se este grupo com o G3 (mães diabéticas / filhos sem FLP) e não foram encontradas diferenças significativas na frequência do rs10830963 entre eles (Tabela 4).

Tabela 2 - Prevalência dos polimorfismos rs10830963 em mães com e sem diabetes mellitus gestacional

rs10830963								
Mães	Alelos	% esperada	% encontrada	Número absoluto esperado	Número absoluto encontrado	Valor de p [#]	Odds ratio	Intervalo confiança
G1	CC	57	60	28	30	0,68	0,84	0,38 a 1,87
	CG+GG	43	40	22	20			
G2	CC	57	65	28	33	0,30	0,65	0,29 a 1,47
	CG+GG	43	35	22	17			
G3	CC	57	36	28	19	0,07	2,38	1,03 a 5,46
	CG+GG	43	64	22	31			
G4	CC	57	53	28	26	0,69	1,17	0,53 a 2,58
	CG+GG	43	47	22	24			

[#]comparação entre o número absoluto encontrado com o número absoluto esperado na população mundial; **G1**= mães sem diabetes mellitus gestacional (DMG) e filhos sem fissuras labiopalatinas (FLP); **G2**= mães sem DMG e filhos com FLP; **G3**= mães com DMG e filhos sem FLP; **G4**= mães com DMG e filhos com FLP; **CC**= ancestral; **CG+GG**= mutados (alelo de risco).

Tabela 3 - Prevalência dos polimorfismos rs10830963 em filhos com e sem fissuras labiopalatinas

rs10830963								
Filhos	Alelos	% esperada	% encontrada	Número absoluto esperado	Número absoluto encontrado	Valor de p [#]	Odds ratio	Intervalo de confiança
G1	CC	57	62	28	31	0,54	0,78	0,35 a 1,73
	CG+GG	43	38	22	19			
G2	CC	57	66	28	33	0,31	0,65	0,29 a 1,47
	CG+GG	43	34	22	17			
G3	CC	57	40	28	20	0,11	1,90	0,86 a 4,22
	CG+GG	43	60	22	30			
G4	CC	57	48	28	24	0,42	1,37	0,62 a 3,02
	CG+GG	43	52	22	26			

[#]comparação entre o número absoluto encontrado com o número absoluto esperado na população mundial; **G1**= mães sem diabetes mellitus gestacional (DMG) e filhos sem fissuras labiopalatinas (FLP); **G2**= mães sem DMG e filhos com FLP; **G3**= mães com DMG e filhos sem FLP; **G4**= mães com DMG e filhos com FLP; **CC**= ancestral; **CG+GG**= mutados (alelo de risco).

Tabela 4 - Comparação da frequência de ocorrência do polimorfismo rs10830963 entre os grupos de mães com e sem diabetes mellitus gestacional

rs10830963			
Mães	Valor de p	Odds ratio	Intervalo de confiança
Sem DMG (G1+G2) vs com DMG (G3+G4)	0,01*	2,08	1,18 a 3,66
G1 vs G2	0,534	1,29	0,57 a 2,92
G1 vs G3	0,029*	2,44	1,09 a 5,46
G1 vs G4	0,420	1,38	0,62 a 3,05
G2 vs G3	0,005*	3,16	1,39 a 7,17
G2 vs G4	0,156	1,79	0,80 a 4,01
G3 vs G4	0,160	1,76	0,79 a 3,91

DMG= diabetes mellitus gestacional; **G1**= mães sem DMG e filhos sem FLP; **G2**= mães sem DMG e filhos com FLP; **G3**= mães com DMG e filhos sem FLP; **G4**= mães com DMG e filhos com FLP; *p<0,05.

4.3 POLIMORFISMO rs1387153

As porcentagens encontradas do polimorfismo rs1387153 em mães sem DMG (G1 e G2) e com DMG (G3 e G4) foram menores do que as encontradas na população geral. Resultados considerados significantes foram observados nos grupos G2 e G3. Na comparação entre os grupos, diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre as mães dos grupos G1 vs G2. Estes resultados estão expressos na Tabela 5.

Da mesma forma que em suas mães, as porcentagens encontradas do polimorfismo rs1387153 nos filhos, foram menores que as encontradas na população geral, em todos os grupos, porém estes resultados não foram considerados significantes (Tabela 6).

Ao agruparmos as mães sem DMG (G1+G2) e compararmos com o grupo de mães com DMG (G3+G4), foi possível observar que a prevalência do rs1387153 foi similar nos dois grupos (Tabela 7).

No intuito de aferir se no grupo de mães diabéticas, cujos filhos nasceram com FLP (G4), a prevalência deste polimorfismo era maior, comparou-se este grupo com o G3 (mães diabéticas / filhos sem FLP) e não foram encontradas diferenças significativas na frequência do rs1387153 entre eles (Tabela 7).

Tabela 5 - Prevalência dos polimorfismos rs1387153 em mães com e sem diabetes mellitus gestacional

rs1387153								
Mães	Alelos	% esperada	% encontrada	Número absoluto esperado	Número absoluto encontrado	Valor de p [#]	Odds ratio	Intervalo de confiança
G1	CC	43	44	21	22	0,84	0,92	0,41 a 2,03
	CT+TT	57	56	29	28			
G2	CC	43	65	21	33	0,02*	0,37	0,16 a 0,83
	CT+TT	57	35	29	17			
G3	CC	43	61	21	31	0,04*	0,44	0,19 a 0,98
	CT+TT	57	49	29	19			
G4	CC	43	45	21	24	0,55	0,78	0,35 a 1,72
	CT+TT	57	55	29	26			

[#]comparação entre o número absoluto encontrado com o número absoluto esperado na população mundial; **G1**= mães sem diabetes mellitus gestacional (DMG) e filhos sem fissuras labiopalatinas (FLP); **G2**= mães sem DMG e filhos com FLP; **G3**= mães com DMG e filhos sem FLP; **G4**= mães com DMG e filhos com FLP; **CC**= Ancestral; **CT+TT**= mutados (alelo de risco); *p≤0,05.

Tabela 6 - Prevalência do polimorfismo rs1387153 em filhos com e sem fissuras labiopalatinas

rs1387153								
Filhos		% esperada	% encontrada	Número absoluto esperado	Número absoluto encontrado	Valor de p [#]	Odds ratio	Intervalo de confiança
G1	CC	43	50	21	25	0,42	0,72	0,32 a 1,59
	CT+TT	57	50	29	25			
G2	CC	43	50	21	25	0,42	0,72	0,32 a 1,59
	CT+TT	57	50	29	25			
G3	CC	43	47	21	23	0,69	0,85	0,38 a 1,87
	CT+TT	57	53	29	27			
G4	CC	43	58	21	29	0,11	0,52	0,23 a 1,16
	CT+TT	57	42	29	21			

[#]comparação entre o número absoluto encontrado com o número absoluto esperado na população mundial; **G1**= mães sem diabetes mellitus gestacional (DMG) e filhos sem fissuras labiopalatinas (FLP); **G2**= mães sem DMG e filhos com FLP; **G3**= mães com DMG e filhos sem FLP; **G4**= mães com DMG e filhos com FLP; **CC**= Ancestral; **CT+TT**= mutados (alelo de risco); *p≤0,05.

Tabela 7 - Comparação da frequência de ocorrência do polimorfismo rs1387153 entre os grupos de mães com e sem diabetes mellitus gestacional

rs1387153			
Mães	Valor de p	Odds ratio	Intervalo de confiança
Sem DMG (G1+G2) vs com DMG (G3+G4)	1,00	1,00	0,57-1,74
G1 vs G2	0,028*	2,47	1,10 a 5,54
G1 vs G3	0,073	2,07	0,93 a 4,61
G1 vs G4	0,688	1,17	0,53 a 2,58
G2 vs G3	0,677	1,18	0,52 a 2,69
G2 vs G4	0,070	2,10	0,93 a 4,71
G3 vs G4	0,160	1,76	0,79 a 3,91

DMG= diabetes mellitus gestacional; **G1**= mães sem DMG e filhos sem FLP; **G2**= mães sem DMG e filhos com FLP; **G3**= mães com DMG e filhos sem fissuras labiopalatinas (FLP); **G4**= mães com DMG e filhos com FLP; *p≤0,05.

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS

Na análise da associação entre as variáveis drogas lícitas e ilícitas, medicamentos com potencial teratogênico, doenças sistêmicas, hipertensão arterial sistêmica e os grupos de mães com e sem DMG, associação significativa foi observada apenas entre a DMG e a HAS. Dentre as mães diabéticas, 40% delas apresentavam HAS, ao passo que nas mães não diabéticas, apenas 14% apresentaram HAS. Este dado foi considerado significativo. Para as demais comparações, não foram observados valores estatisticamente significantes. Estes dados estão descritos na Tabela 8.

Na análise da associação entre as variáveis drogas lícitas e ilícitas, medicamentos com potencial teratogênico, doenças sistêmicas, hipertensão arterial sistêmica e os grupos de filhos com e sem FLP, valores estatisticamente significantes não foram observados (Tabela 9).

Na comparação da idade materna entre os grupos de mães com e sem DMG, constatou-se idade significativamente mais elevada em mães diabéticas (Tabela 10). Já, na comparação da idade materna entre os grupos de filhos com e sem FLP, não foram constatadas diferenças significantes (Tabela 11).

Tabela 8 - Associação entre o diabetes mellitus gestacional e as variáveis drogas lícitas e ilícitas, medicamentos com potencial teratogênico, doenças sistêmicas, hipertensão arterial sistêmica

	DLI		MED		DS		HAS	
	N n (%)	S n (%)	N n (%)	S n (%)	N n (%)	S n (%)	N n (%)	S n (%)
Sem DMG								
(G1+G2) (n=100)	87 (87%)	13 (13%)	92 (92%)	8 (8%)	94 (94%)	6 (6%)	86 (86%)	14 (14%)
Com DMG								
(G3+G4) (n=100)	83 (83%)	17 (17%)	89 (89%)	11 (11%)	89 (89%)	11 (11%)	60 (60%)	40 (40%)
valor de p	0,43		0,47		0,21		0,00*	

DLI= drogas lícitas e ilícitas; MED= medicamentos com potencial teratogênico; DS= doenças sistêmicas; HAS= hipertensão arterial sistêmica; N= não; S= sim; DMG= diabetes mellitus gestacional; G1+G2= mães sem DGM; G3+G4= mães com DGM; *p≤(0,05).

Tabela 9 - Associação entre as fissuras labiopalatinas e as variáveis drogas lícitas e ilícitas, medicamentos com potencial teratogênico, doenças sistêmicas, hipertensão arterial sistêmica

	DLI		MED		DS		HAS	
	N n (%)	S n (%)	N n (%)	S n (%)	N n (%)	S n (%)	N n (%)	S n (%)
Sem FLP								
G1+G3 (n=100)	79 (79%)	21 (21%)	92 (92%)	8 (8%)	92 (92%)	8 (8%)	78 (78%)	22 (22%)
Com FLP								
G2+G4 (n=100)	92 (92%)	8 (8%)	94 (94%)	6 (6%)	98 (98%)	2 (2%)	81 (81%)	19 (19%)
valor de p	0,06		0,27		0,50		0,88	

DLI= drogas lícitas e ilícitas; MED= medicamentos com potencial teratogênico; DS= doenças sistêmicas; HAS= hipertensão arterial sistêmica; FLP= fissuras labiopalatinas; N= NÃO; SIM; G1+G3= filhos sem FLP; G3+G4= filhos com FLP; *p≤(0,05).

Tabela 10 - Comparação da idade materna entre os grupos de mães com e sem diabetes mellitus gestacional

Grupos	Idade ($\bar{X} \pm DP$)
Sem DMG	
G1+G2 (n=100)	27,8 $\pm$ 7,4
Com DMG	
G3+G4 (n=100)	31,63 $\pm$ 5,9
valor de p	0,03*

$\bar{X} \pm DP$ = média $\pm$ desvio padrão; **DMG**= diabetes mellitus gestacional; **G1+G2**= mães sem DGM; **G3+G4**= mães com DGM; *p $\leq$ (0,05).

Tabela 11 - Comparação da idade materna entre os grupos de filhos com e sem fissuras labiopalatinas

Grupos	Idade ($\bar{X} \pm DP$)
Sem FLP	
G1+G3 (n=100)	30,1 $\pm$ 7,2
Com FLP	
G2+G4 (n=100)	29,3 $\pm$ 6,7
valor de p	0,44

$\bar{X} \pm DP$ = média $\pm$ desvio padrão; **FLP**= fissuras labiopalatinas.

5 DISCUSSÃO

---

5 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo indica que a prevalência do polimorfismo rs10830963 é maior no grupo de mães diabéticas (G3+G4), o que confirma a hipótese inicial desta investigação. Na análise das mães diabéticas agrupadas, demonstrou-se que a chance de ocorrência desse polimorfismo no grupo de mães diabéticas é 2 vezes maior. Estes dados estão de acordo com a literatura, que demonstra haver associação entre o polimorfismo rs10830963 e a DMG (RÖNN et al., 2009; HUOPIO et al., 2013). Na análise de cada grupo de mães, a frequência deste polimorfismo foi maior do que na população geral, porém não significativa. Já, na comparação entre os quatro grupos, diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre as mães dos grupos G1 vs G3 e G2 vs G3. Os motivos pelos quais diferenças não foram detectadas entre o G4 e os grupos G1 e G2 são incertos. Entende-se que, em uma amostra mais robusta, uma diferença significativa também seria observada.

Causou-nos interesse saber se, no grupo de mães diabéticas, cujos filhos nasceram com fissura, a prevalência do polimorfismo rs10830963, era maior. Para tanto, comparou-se este grupo com o grupo de mães diabéticas e de seus filhos sem FLP e não foram encontradas diferenças significativas, sugerindo que este polimorfismo não está diretamente ligado à ocorrência das FLP. Com relação aos filhos, a mesma frequência de ocorrência deste polimorfismo foi observada em relação à população mundial.

Contrariamente ao esperado, uma menor prevalência do polimorfismo rs1387153 foi observada em todos os grupos, inclusive nos grupos de mães com DMG. Apesar dos resultados indicarem uma porcentagem significativamente menor para o rs1387153 em relação à população geral, estes resultados aparentam não ter relevância clínica. Na comparação entre os grupos de mães, diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos G1 vs G2. Os motivos que justificam esta diferença não são evidentes, pois a única variável entre os dois grupos é a presença da fissura (G2), aparentemente não relacionada a este polimorfismo. Como o Brasil tem uma população miscigenada, diferenças na etnia podem ser uma das causas para este resultado. Alguns atributos genéticos podem

conferir proteção ou risco para o desenvolvimento do DMG em populações de ancestralidades diferentes. Seria interessante estratificar os grupos quanto à etnia o que não é tarefa simples, pois nem a cor da pele nem a região de origem podem diferenciar de uma forma adequada uma população miscigenada.

A análise comparativa unindo os heterozigotos e os homozigotos mutados tem como base a presença de um alelo de risco, ou seja, G para o rs10830963 e o T para o rs1387153. Assim, considerou-se que a presença deste alelo constituía um fator que aumenta a chance de ocorrência do DMG. Este tipo de análise agrupada tem sido utilizada com frequência na literatura (LYSSENKO et al., 2009; PROKOPENKO et al., 2009).

Quanto aos resultados do polimorfismo rs1387153 nos filhos, não foram observadas diferenças significativas entre os valores esperados e encontrados, o que é plausível, pois este SNP está, teoricamente, relacionado ao aparecimento do DMG e não às FLPs. Isto vale também para o rs10830963.

Com relação às características maternas, especificamente a idade materna, observou-se idade mais elevada em mães diabéticas. Em outras palavras, podemos inferir que quanto maior a idade materna, maior o risco de desenvolver DMG. Estes dados se confirmam na literatura (TARRY-ADKINS; OZANNE, 2016). Por outro lado, a idade materna não diferiu nos grupos de filhos com e sem FLP. Isto significa que o fator idade não influenciou, na amostra estudada, a ocorrência de FLP.

Ainda com relação às particularidades das mães da presente amostra, consideração sobre a raça deve ser feita. Foi utilizado como critério de determinação da raça a autodeclaração das mães, e a raça branca foi a mais encontrada em 56% da amostra, seguida da raça parda, em 37%, o que se assemelha à distribuição da população brasileira de acordo com o IBGE. Quanto à distribuição da população brasileira por raça, o IBGE afirma que há predominância da raça branca (54%), seguida da parda (40%), negra (5%) e amarela (1%). O critério utilizado pelo IBGE para esta classificação de raça ou cor é também a autodeclaração, critério este utilizado pelos serviços de saúde em atenção à Portaria nº 719 de 28/12/2007, ou seja:

artigo 1º: incluir o campo raça/cor nos sistemas de informação ambulatorial e hospitalar (SAI/SIH/SUS) para efetivação do registro nos instrumentos de coleta de dados de identificação do usuário do SUS, atendendo a

classificação expressada pelo próprio usuário ou seu responsável [...] (BRASIL, 2007).

Quanto à DMG, observada nas mães dos grupos G3 e G4, apesar de nem todas as mães apresentarem o exame de glicemia realizado no período gestacional, o que comprovava a presença do DMG, foi possível a confirmação deste diagnóstico, também auto-referido pelas mães, por meio da informação relatada por elas do uso de hipoglicemiantes orais, como a metformina ou glibenclamida, ou ainda, da aplicação de insulina, o que não deixava dúvidas com relação ao diagnóstico. Contudo, acredita-se que o acompanhamento materno no pré-natal, a fim de monitorar os níveis glicêmicos neste período, traria informações adicionais sobre a gravidade do DMG e o impacto desta doença sobre o feto e, até mesmo, sobre os polimorfismos estudados. É importante mencionar, neste momento, que a Sociedade Brasileira de Diabetes indica a insulina como tratamento padrão, que o *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE), recomenda o uso de metformina e a *International Diabetes Federation* (IDF) indica a glibenclamida e a metformina como opção (WEINERT et al., 2011). Por estes motivos, estes foram os fármacos considerados na eleição das mães do G3 e G4 para comporem os grupos.

É importante frisar que durante o processo de entrevista com as mães, nos deparamos com um alto índice de mulheres que tiveram glicemias ≥ 92 mg/dl e não foram diagnosticadas como tendo DMG. Essas mulheres não foram eleitas para participarem desse estudo, pelo fato de que não foram tratadas com nenhum hipoglicemiante oral nem insulina. Entende-se, contudo, que essas mães apresentavam claro diagnóstico de DMG, segundo os critérios da Associação Americana de Diabetes e da Federação Internacional de Diabetes, e não foram adequadamente acompanhadas e tratadas.

A hipertensão arterial sistêmica foi a doença mais prevalente nos grupos de mães diabéticas. Foi observada, por exemplo, em 50% das mães do G3 em apenas 4% das mães do G1. Por este motivo, forte associação entre DMG e HAS foi demonstrada no presente estudo. Contudo, vale ressaltar que, como os valores pressóricos não foram monitorados durante a gestação, somente foram incluídas no estudo mães que confirmaram o uso de anti-hipertensivos, fornecendo informações como nome do medicamento e dosagem. Ressalte-se, ainda, que como a hipertensão arterial é, muitas vezes, negligenciada, inclusive na gestação, não

podemos garantir que a incidência de HAS seja, de fato, a apresentada neste estudo. Na verdade, acredita-se que esta incidência seja maior.

Na avaliação global dos grupos, quanto às doenças sistêmicas que acometeram as mães durante o período gestacional, dentre as mais expressivas, a sífilis foi relatada por sete (4%) mães, seguida da epilepsia relatada por duas (1%) mães, assim como a dengue, hepatite, toxoplasmose e outras infecções de uma forma geral.

O Ministério da Saúde (MS) alerta que o Brasil vive uma epidemia de sífilis. De acordo com o MS, os casos de sífilis em gestantes apresentaram um crescimento de 21%, enquanto as infecções por sífilis congênita (transmitida pela mãe ao bebê) subiram 19%, entre 2014 e 2015. Os números indicam que metade dos casos de sífilis gestacional são detectados no último trimestre da gestação, quando o bebê já está formado e as chances de protegê-lo são bem menores do que quando o tratamento começa no início da gestação (BRASIL, 2015). Este é um dado alarmante, mas, na presente amostra, não foi observada relação entre a presença de doenças sistêmicas e a ocorrência de fissuras labiopalatinas.

Mesmo frente às campanhas nacionais sobre os efeitos nocivos do uso de drogas lícitas e ilícitas durante o período gestacional, foram encontradas, na amostra estudada, algumas mães que fizeram uso dessas substâncias na gestação. Quanto ao uso do tabaco 18 (9%) mães, confirmaram o uso durante a gestação. Já o uso do álcool foi relatado por 11 (5%) mães e o uso de drogas ilícitas somente por uma (1%) mãe. Esse número reduzido de mães que admitiu ter usado drogas ilícitas, provavelmente se deve ao fato de que as entrevistas se davam geralmente nas enfermarias da Maternidade Santa Isabel, do Posto de Saúde ou mesmo no Ambulatório do HRAC. Nos três locais, as mulheres ficavam muito próximas uma das outras, o que poderia causar constrangimento em admitir o uso de tais drogas. Em estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (TRINDADE-SUEDAM et al., 2016), o uso de drogas lícitas ou ilícitas foi relatado por 32% das mães de crianças com FLP, contra apenas 6% do presente estudo. O número aumentado do relato do uso de drogas na amostra daquele estudo se deve ao ambiente físico mais privativo no qual foram coletadas as informações, o que, certamente, favoreceu o relato.

Mais uma vez, apesar de ter sido constatado o uso de drogas lícitas e ilícitas, medicamentos com comprovado efeito teratogênico e doenças sistêmicas

que acometeram as mães da amostra estudada, não foram evidenciadas associações entre essas variáveis e a ocorrência de DMG ou de FLP.

Com relação aos filhos, a fissura mais prevalente (grupos G2 e G4) foi a fissura de lábio e palato (transforame incisivo), em 60% das crianças, seguida das fissuras de palato (pós-forame incisivo), em 26% das crianças. Inicialmente, a faixa etária definida para as crianças na amostra estudada era de 0-3 anos. Contudo, pela dificuldade em se conseguir o “n” total estabelecido pelo cálculo amostral, foi necessário ampliar esse intervalo de idade para crianças de 0-10 anos. Esta conduta foi baseada na premissa de que a sequência de bases nitrogenadas do DNA é a mesma desde a concepção.

Existem relativamente poucas pesquisas que visam compreender as bases genéticas do DMG e sua relação com a ocorrência das FLP. Dentre os fatores que dificultam os estudos genéticos desta patologia, é encontrar e acompanhar mulheres que pretendam ficar grávidas – o acompanhamento no período anterior à gravidez é importante, já que é feito todo um estudo baseado no histórico das pacientes - e encontrar famílias com múltiplos casos de DMG, o que está relacionado à prevalência da doença (WATANABE et al., 2007). Observou-se que, em alguns filhos, foram encontrados alelos mutados que não foram observados nas respectivas mães. Isto evidencia a importância da análise familiar completa, isto é, a inclusão do pai em futuros estudos dessa natureza.

A investigação mais aprofundada dos filhos, incluindo dados demográficos que vão além das fissuras, tais como características raciais, idade, anomalias relacionadas e doenças e condições observadas ao nascimento, como peso ao nascer e macrossomia, além de polimorfismos genéticos relacionados exclusivamente às fissuras, como o PAX7, PAX9, IRF6 e FOXE1 devem ser foco de investigação futura, além, como já mencionado, da investigação do trio, pai-mãe-filho.

Assim sendo, o principal achado do presente estudo confirma a hipótese inicial de que a prevalência do polimorfismo rs10830963 é maior no grupo de mães diabéticas. É importante ressaltar que, nestas mães, a chance de ocorrência deste polimorfismo foi o dobro. Já, para o rs1387153, a hipótese inicial não foi confirmada. Em outras palavras, não foi constatada maior prevalência deste polimorfismo nas mães com diabetes mellitus gestacional. Deste modo, a presença deste

polimorfismo não constitui fator de risco para a ocorrência das fissuras labiopalatinas. Com relação à idade materna, foi possível observar que a idade materna constitui fator de risco para o diabetes mellitus gestacional.

Em suma, apesar de ter sido observada uma maior prevalência do polimorfismo rs10830963 nas mães diabéticas, este fato provavelmente não foi determinante para o aparecimento das fissuras labiopalatinas em seus filhos, na amostra estudada.

6 CONCLUSÕES

---

6 CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- a prevalência do polimorfismo rs10830963 no gene que codifica o receptor 1B da melatonina foi duas vezes maior no grupo de mães diabéticas comparado ao grupo de mães não diabéticas;
- a prevalência do polimorfismo rs1387153 no gene que codifica o receptor 1B da melatonina foi similar nos grupo de mães com e sem diabetes mellitus gestacional;
- a chance de ocorrência do polimorfismo rs10830963 em mães com diabetes mellitus gestacional é duas vezes maior que no grupo de mães sem diabetes mellitus gestacional;
- a chance de ocorrência do polimorfismo rs1387153 em mães com diabetes mellitus gestacional é similar ao grupo de mães sem diabetes mellitus gestacional;
- houve associação entre presença do diabetes mellitus gestacional e hipertensão arterial. Para as demais variáveis (uso de drogas lícitas e ilícitas, uso de medicamentos com potencial teratogênico e presença de doenças sistêmicas), não foi observada nenhuma associação;
- não foi observada qualquer associação entre a ocorrência de fissuras labiopalatinas e as variáveis: uso de drogas lícitas e ilícitas, uso de medicamentos com potencial teratogênico ingeridos durante a gestação, a presença de doenças sistêmicas e hipertensão arterial na gestação;
- houve associação entre a ocorrência de diabetes mellitus gestacional e a idade materna;
- não houve associação entre a fissuras labiopalatinas e a idade materna.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aberg A, Westbom L, Källén B. Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. *Early Hum Dev*. 2001;61(2):85-95.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27(Suppl 1):S5-10.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus (Position Statement). *Diabetes Care*. 2011;34(Suppl 1):S62-9.

Arendt J, Skene DJ. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*. 2005;9(1):25-39.

Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *Eur J Surg Oncol*. 2004;30(6):593-601.

Becerra JE, Khoury MJ, Cordero JF, Erickson JD. Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population based case control study. *Paediatrics*. 1990;85(1):1-9.

Ben-Haroush A, Yogev Y, Hod M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2004;21(2):103-13.

Benjamin L. Genes VII. São Paulo, SP: Artmed; 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Secretaria de Assistência a Saúde. Portaria nº 719, de 28 de dezembro de 2007 [acesso em: 2016 nov. 11]. Disponível em: www.saude.mt.gov.br/arquivo/2660/legislacao.

Brasil. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e hepatites virais. Boletim epidemiológico sífilis 2015, Ministério da Saúde; 2015 [acesso em: 2016 nov. 11]. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/57978/p_boletim_sifilis_2015_fechado_pdf_p_18327.pdf.

Carmichael SL, Shaw GM, Ma C, Werler MM, Rasmussen SA, Lammer EJ; National Birth Defects Prevention Study. Maternal corticosteroid use and orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197(6):585.e1-7; discussion 683-4, e1-7.

Casson IF, Clarke CA, Howard CV, McKendrick O, Pennycook S, Pharoah PO, et al. Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *BMJ*. 1997;315(7103):275-8.

Diewert VM. A morphometric analysis of craniofacial growth and changes in spatial relations during secondary palatal development in human embryos and fetuses. *Am J Anat*. 1983;167(4):495-522.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. São Paulo: AC Farmacêutica; 2014.

Fuhrmann K, Reiher H, Semmler K, Fischer F, Fischer M, Glöckner E. Prevention of congenital malformations in infants of insulin dependent diabetic mothers. *Diabetes care*. 1983;6(3):219-23.

García-Patterson A, Erdozain L, Ginovart G, Adelantado JM, Cubero JM, Gallo G, et al. In human gestational diabetes mellitus congenital malformations to pre-pregnancy body mass index and to severity of diabetes. *Diabetologia*. 2004;47(3):509-14.

Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26(11):3160-7.

Gili JA, Poletta FA, Giménez LG, Pawluk MS, Campaña H, Castilla EE, López-Camelo JS. Descriptive analysis of high birth prevalence rate geographical clusters of congenital anomalies in South America. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2016;106(4):257-66.

Gorlin RJ, Cohen MM, Levin LS. *Syndromes of the Head and Neck*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1990.

Greene MF, Solomon CG. Gestational diabetes mellitus: time to treat. *N Eng J Med*. 2005;352(24):2544-6.

Gupta V, Vinay DG, Rafiq S, Kranthikumar MV, Janipalli CS, Giambartolomei C, et al. Association analysis of 31 common polymorphisms with type 2 diabetes and its related traits in Indian sib pairs. *Diabetologia*. 2012;55(2):349-57.

Guton JE, McElduff A, Sulway M, Stiel J, Kelso I, Boyce S, et al. Outcome of pregnancies complicated by pregestacional diabetes mellitus. *Aust NZ J Obstet Gynaecol*. 2000;40(1):38-43.

HAPO Study Cooperative Research Group. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002;78(1):69-77.

HAPO Study Cooperative Research Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med*. 2008;358(19):1991-2002.

Huopio H, Cederberg H, Hakkarainen H, Pääkkönen M, Kuulasmaa T, Heinonen S, et al. Association of risk variants for type 2 diabetes and hyperglycemia with gestational diabetes. 2013;169(3):291-7.

International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33(3):676-82.

Janssen PA, Rothman I, Schwartz SM. Congenital malformations in newborns of women with established and gestational diabetes in Washington State, 1984-91. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 1996;10(1):52-63.

Kitzmiller JL, Buchanan TA, Kjos S, Combs CA, Ratner RE. Preconception care of diabetes, congenital malformations and spontaneous abortions. *Diabetes Care*. 1996;19(5):514-41.

Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *2002;32(2):285-9*.

Kostrisch LMV. Prevalência de diabetes mellitus em mães de crianças com fissuras labiopalatinas [dissertação]. Bauru, SP: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2012.

Landon MB, Spong CY, Thom E, Carpenter MW, Ramin SM, Casey B, et al. A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *N Engl J Med*. 2009;361(14):1339-48.

Lardone PJ, Alvarez-Sanchez SN, Guerrero JM, Carrillo-Vico A. Melatonin and glucose metabolism: clinical relevance. *Curr Pharm Des*. 2014;20(30):4841-53.

Lebby KD, Tan F, Brown CP. Maternal factors and disparities associated with oral clefts. *Ethn Dis*. 2010;(Suppl 1):S1-146-9.

Lima JM, Serafim PV, Silva ID, Forones NM. Role of the genetic polymorphism of p53 (codon 72) gene in colorectal cancer. *Arq Gastroenterol*. 2006;43(1):8-13.

Liu C, Wu Y, Li H, Qi Q, Langenberg C, Loos RJ, Lin X. MTNR1B rs10830963 is associated with fasting plasma glucose, HbA1C and impaired beta-cell function in Chinese Hans from Shanghai. *BMC Med Genet*. 2010;11:59.

Lobo Junior JP, Frigeri HR, Dos Santos-Weiss IC, de Souza EM, Rego FG, Picheth G, Alberton D. The MTNR1B gene polymorphism rs10830963 is associated with gestational diabetes in a Brazilian population. *Gene*. 2015;568(1):114-5.

Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spégel P, et al. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet*. 2009;41(1):82-8.

Materna-Kiryluk A, Więckowska B, Wiśniewska K, Borszewska-Kornacka MK, Godula-Stuglik U, Limon J, et al. Maternal reproductive history and the risk of isolated congenital malformations. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2011;25(2):135-43.

Menezes AJ, Diniz EMA, Simoes A, Vaz FAC. Morbidade neonatal em recém-nascidos de mães com diabetes gestacional. *Pediatrics*. 1999;21(1):30-6.

- Miller E, Hare J, Clohety J, Dunn PJ, Gleasson RE, Soeldner JS, et al. Elevated maternal HbA 1c in early pregnancy and major congenital anomalies in infants of diabetic mothers. *N Engl J Med*. 1981;304(22):1331-34.
- Mills JL. Malformations in infants of diabetic mothers. *Tetralogy*. 1982;25(3):385-94.
- Mølgaard-Nielsen D, Hviid A. Newer-generation antiepileptic drugs and the risk of major birth defects. *JAMA*. 2011;305(19):1996-2002.
- Montenegro CAB, Rezende Filho J. *Obstetrícia fundamental*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Mulder H, Nagorny CL, Lyssenko V, Groop L. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene. *Diabetologia*. 2009;52(7):1240-9.
- Nagorny C, Lyssenko V. Tired of diabetes genetics? Circadian rhythms and diabetes: the MTNR1B story? *Curr Diab Rep*. 2012;12(6):667-72.
- Novas diretrizes para diabetes mellitus gestacional. Notícias. 03 maio 2010 [acesso 2016 nov. 12]. Disponível em: <http://www.febrasgo.org.br/site/?p=1528>.
- Organização Pan-Americana da Saúde. Prevenção e controle de enfermidades genéticas e os defeitos congênitos. Relatório de um grupo de consulta. Publicação científica n. 460. Washington (EUA): OPAS/OMS; 1984.
- Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, et al. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat Genet*. 2009;41(1):77-81.
- Ray JG, Vermeulen MJ, Shapiro JL, Kenshole AB. Maternal and neonatal outcomes in pregestational and gestational diabetes mellitus, and the influence of maternal obesity and weight gain: the DEPOSIT study. *Diabetes Endocrine Pregnancy Outcome Study in Toronto*. *QJM*. 2001;94(7):347-56.
- Reece AE, Homko CJ. Why do diabetic women deliver malformed infants? *Clin Obstet Gynecol*. 2000;43(1):32-45.
- Reece EA, Hobbins JC. Diabetic embriopathy: pathogenesis, prenatal diagnosis and prevention. *Obstet Gynaecol Surv*. 1986;41(6):325-35.
- Rocha AP, Magalhães PKR, Maia AL, Maciel LMZ. Polimorfismos genéticos: implicações na patogênese do carcinoma medular de tireóide. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2007;51(5):723-30.
- Rönn T, Wen J, Yang Z, Lu B, Du Y, Groop L, et al. A common variant in MTNR1B, encoding melatonin receptor 1B, is associated with type 2 diabetes and fasting plasma glucose in Han Chinese individuals. *Diabetologia*. 2009;52(5):830-3.

- Sabbagh HJ, Alamoudi NM, Abdulhameed FD, Innes NP, Al-Aama JY, Hummida T, et al. Environmental risk factors in the etiology of nonsyndromic orofacial clefts in the western region of Saudi Arabia. *Cleft Palate Craniofac J*. 2016;53(4):435-43.
- Schaefer UM, Songster G, Xiang A, Berkowitz K, Buchanan TA, Kjos SL. Congenital malformations in offspring of women with hyperglycemia first detected during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;177(5):1165-71.
- Schmidt MI, Duncan BB, Reichelt AJ, Branchtein L, Matos MC, Costa A, et al. Gestacional diabetes mellitus diagnosed with a 2-h 75-g oral glucose tolerance test and adverse pregnancy outcomes. *Diabetes Care*. 2001;24(7):1151-5.
- Scutariu MD, Ciupilan C. Chief teratogenic factors in facial abnormalities. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2006;110(2):399-402.
- Segre CAM, Santoro Junior. M. Recém-nascido de mãe diabética. In: Segre CAM. *Perinatologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Sarvier; 2002. p. 72-5.
- Seraphim PM, Sumida DH, Nishide FT, Lima FB, Cipolla Neto J, Machado UF. A glândula pineal e o metabolismo de carboidratos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2000;44(4):331-8.
- Shaw WC, Semb G. Princípios e estratégias da reabilitação: recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS). In: Trindade IEK, Silva Filho OG, coordenadores. *Fissuras labiopalatinas: uma abordagem interdisciplinar*. São Paulo: Santos; 2007. p. 1-5.
- Silva Filho OG, Freitas JAS. Caracterização morfológica e origem embriológica. In: Trindade IEK, Silva Filho OG, coordenadores. *Fissuras labiopalatinas: uma abordagem interdisciplinar*. São Paulo: Santos; 2007. p.17-49.
- Silverthorn DU. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
- Sperber GH. *Craniofacial embryology*. 4th ed. London: Wright; 1989.
- Spilson SV, Kim HJ, Chung KC. Association between maternal diabetes mellitus and newborn oral cleft. *Ann Plast Surg*. 2001;47(5):477-81.
- Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classificação das fissuras lábio-palatinas: sugestão de modificação. *Rev Hosp Fac Med São Paulo*. 1972;27(1):5-6.
- Starikov R, Bohrer J, Goh W, Kuwahara M, Chien EK, Lopes V, Coustan D. Hemoglobin A1c in pregestational diabetic gravidas and the risk of congenital heart disease in the fetus. *Pediatr Cardiol*. 2013;34(7):1716-22.
- Suhonen L, Hiilesmaa V, Teramo K. Glycaemic control during early pregnancy and fetal malformations in women with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2000;43(1):79-82.

- Tang S, Peng W, Wang C, Tang H, Zhang Q. Association of the PTPN22 gene (+1858C/T, -1123G/C) polymorphisms with type 1 diabetes mellitus: asystematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;97(3):446-52.
- Tarry-Adkins JL, Ozanne SE. Nutrition in early life and age-associated diseases. *Ageing Res Rev.* 2016;pii: S1568-1637(16):30179-9.
- Towner D, Kjos SL, Leung B, Montoro MM, Xiang A, Mestnay JH, et al. Congenital malformations in pregnancies complicated by NIDDM. *Diabetes Care.* 1995;18(11):1446-51.
- Trindade-Suedam IK, Kostrisch LMV, Pimenta LAF, Negrato CAo, Franzolin SB, Trindade Junior AS. Diabetes mellitus and drug abuse during pregnancy and the risk for orofacial clefts and related abnormalities. *Rev Latino-Am Enfermagem.* 2016;24: e2701.
- Watanabe RM, Black MH, Xiang AH, Allayee H, Lawrence JM, Buchanan TA. Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30 Suppl 2:S134-40.
- Weinert LS, Silveiro SP, Oppermann ML, Salazar CC, Simionato BM, Siebeneichler A, et al. Gestational diabetes management: a multidisciplinary treatment algorithm. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011;55(7):435-45.
- Williams A, Modder J. Management of pregnancy complicated by diabetes--maternal control during pregnancy and neonatal management. *Early Hum Dev.* 2010;86(5):269-73.
- World Health Organization. Diabetes. c2016. [cited 2016 Nov. 10]. Available from: http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/.
- Xia Q, Chen ZX, Wang YC, Ma YS, Zhang F, Che W, Fu D, Wang XF. Association between the melatonin receptor 1B gene polymorphism on the risk of type 2 diabetes, impaired glucose regulation: a meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(11):e50107.
- Yang L, Zhou X, Luo Y, Sun X, Tang Y, Guo W, Han X, Ji L. Association between KCNJ11 gene polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus in East Asian populations: a meta-analysis in 42,573 individuals. *Mol Biol Rep.* 2012;39(1):645-59.
- Yazdy MM, Mitchell AA, Liu S, Werler MM. Maternal dietary glycaemic intake during pregnancy and the risk of birth defects. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2011;25(4):340-6.
- Zhang C, Bao W, Rong Y, Yang H, Bowers K, Yeung E, Kiely M. Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2013;19(4):376-90.

APÊNDICE

APÊNDICE A

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____ DN: _____

Endereço: _____

Estado civil _____ Cor: _____

Escolaridade: _____ Profissão: _____

Dados relacionados a mãe:

1- Você teve diabetes gestacional na gravidez do filho fissurado? ( ) SIM ( ) NÃO

2- Você apresentou hipertensão arterial durante a gestação? ( ) SIM ( ) NÃO

3- Que doenças você foi acometida durante a gestação?

_____
_____
_____

4- Você fumou durante a gestação? ( ) SIM ( ) NÃO

5- Ingeriu bebidas alcoólicas durante a gestação? ( ) SIM ( ) NÃO

6- Fez uso de drogas ilícitas durante a gestação? ( ) SIM ( ) NÃO

7- Que tipo de medicação você usou durante a gestação?

_____
_____
_____

Dados relacionados a criança:

1- Nome da criança: _____ DN: _____

2- Tipo de fissura: _____

3- Outras anomalias associadas? ( ) SIM ( ) NÃO

4- Em caso afirmativo, qual ou quais? _____

ANEXOS

ANEXO A - Ofício de aprovação do projeto, emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC-USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CONTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs10830963 E rs1387153 NO GENE DA MELATONINA PARA OCORRÊNCIA DE DIABETES MELLITUS GESTACIONAL E FISSURAS LABIOPALATINAS

Pesquisador: Lilia Maria von Kostrisch

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 27187214.3.0000.5441

Instituição Proponente: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP

Patrocinador Principal: Universidade de Sao Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 815.454

Data da Relatoria: 30/09/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa para tese de doutorado da enfermeira Lília Maria Von Kostrisch, orientado pela Profª Drª Ivy K.T.Suedam, para estudar a prevalência dos polimorfismos no gene que codifica o receptor 1B da melatonina em mães com e sem diabetes gestacional e em seus filhos com e sem fissuras labiopalatinas e ainda investigar possível associação entre os polimorfismos no gene do receptor 1B da melatonina e os polimorfismos no IRF6, PAX9 e PAX7 sabidamente associados às fissuras labiopalatinas em mães com e sem diabetes gestacional e em seus filhos com e sem fissuras labiopalatinas. Para isso, avaliarão 4 grupos sendo Grupo 1: 50 mães sem diabetes gestacional e seus filhos sem fissuras labiopalatinas. Grupo 2: 50 mães sem diabetes gestacional e seus filhos com fissuras labiopalatinas. Grupo 3: 50 mães com diabetes gestacional e seus filhos com fissuras labiopalatinas. Grupo 4: 50 mães com diabetes gestacional e seus filhos sem fissuras labiopalatinas. Será coletada saliva dos pacientes em seguida as amostras serão armazenadas em freezer de -20°C. Para a extração de DNA da saliva será utilizado metodologia detalhadamente explicada no projeto.

Objetivo da Pesquisa:

-Investigar a prevalência dos polimorfismos no gene que codifica o receptor 1B da melatonina

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-900
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8421 **Fax:** (14)3234-7818 **E-mail:** uep_projeto@centrinho.usp.br

Continuação do Parecer: 815.454

(rs10830963 e rs1387153) em mães com e sem diabetes gestacional e em seus filhos com e sem fissuras labiopalatinas;-Investigar se há associação entre os polimorfismos no gene do receptor 1B da melatonina e polimorfismos rs2235371 (IRF6), rs2073247 e rs17176643 (PAX9) e rs742071 (PAX7) sabidamente associados às fissuras labiopalatinas em mães com e sem diabetes gestacional e em seus filhos com e sem fissuras labiopalatinas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores salientaram que eventualmente poderão ocorrer algum constrangimento por parte das mães entrevistadas no momento da coleta de dados pessoais e coleta de saliva, sendo garantido às mesmas e aos bebês, o anonimato e lugar reservado para a coleta de saliva individual. Para coleta de saliva nos bebês com swab na mucosa oral, poderá, ainda que remotamente, ocorrer episódios de choro, náuseas e vômitos.

Os benefícios esperados constituem grande contribuição ao conhecimento dos polimorfismos que serão investigados, com o intuito de se verificar se esses polimorfismos induzem ou não ao aparecimento de diabetes mellitus e fissuras

labiopalatinas. Portanto, os benefícios são maiores que os mínimos riscos aqui relatados, uma vez que todo material será de uso único, estéril, tomando-se toda precaução para que a entrevista e coleta de saliva seja o menos traumático possível. A garantia dos benefícios resultantes da presente pesquisa será na forma de retorno social e científico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa muito interessante e de valor científico, que havia ficado com pendência devido à inadequações do capítulo "Análise crítica de Riscos e Benefícios" da pesquisa. Os autores refizeram esse capítulo, conforme requisitado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Carta de encaminhamento dos pesquisadores aos CEP;

Formulário HRAC;

Folha de Rosto Plataforma Brasil;

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

Termo de Assentimento;

Termo de Compromisso de Manuseio de Informações;

Formulário de Permissão para uso de Registros para Fins Científicos;

Termo de Compromisso de Tornar Públicos os Resultados da Pesquisa e Destinação de Materiais

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA

CEP: 17.012-900

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)3235-8421

Fax: (14)3234-7818

E-mail: uep_projeto@centrinho.usp.br

Continuação do Parecer: 815.454

ou Dados Coletados;

Análise Crítica dos Riscos e Benefícios;

Critérios para Suspender ou Encerrar as Pesquisas;

Termo de Compromisso do Pesquisador Responsável.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como as pendências foram resolvidas adequadamente, sugiro a aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deve atentar que o projeto de pesquisa aprovado por este CEP refere-se ao protocolo submetido para avaliação. Portanto, conforme a Resolução CNS 466/12, o pesquisador é responsável por "desenvolver o projeto conforme delineado", se caso houver alterações nesse projeto, este CEP deverá ser comunicado em emenda via Plataforma Brasil, para nova avaliação.

Cabe ao pesquisador notificar via Plataforma Brasil o relatório final para avaliação, assim como os relatórios semestrais, os Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos e/ou outros Termos obrigatórios, quando solicitados no parecer.

BAURU, 01 de Outubro de 2014

Assinado por:
Marcia Ribeiro Gomide
(Coordenador)

Endereço: SILVIO MARCHIONE 3-20
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA   **CEP:** 17.012-900
UF: SP   **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8421   **Fax:** (14)3234-7818   **E-mail:** uep_projeto@centrinho.usp.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr.(a) _____, portador da cédula de identidade _____, responsável por

_____, após leitura minuciosa deste documento, devidamente explicado pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa: **“Contribuição dos Polimorfismos rs10830963 e rs1387153 no gene da melatonina para ocorrência de diabetes mellitus gestacional e fissuras labiopalatinas”**, realizada por Lilia Maria von Kostrisch, Coren 36740, sob orientação da Profa. Dra. Ivy Kiemle Trindade Suedam, CRO 66508/SP, que tem por objetivo investigar se existe uma correlação entre a diabetes e alterações genéticas que possivelmente deram origem as fissuras. Será feita uma entrevista de aproximadamente 20 minutos, onde será coletada a sua saliva e a de seu filho para realização de exames laboratoriais que indicarão se existe ou não essa correlação. Será utilizado um tubo no qual você e seu filho devem depositar a saliva, ou um cotonete que será esfregado levemente na bochecha com o intuito de colher material orgânico para análise genética. Este é um procedimento que não causa dor nem desconforto ou constrangimento. Os dados coletados e os resultados serão mantidos em sigilo.

Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC-USP, pelo endereço: Rua Silvio Marchione, nº 3-20 no serviço de apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão ou pelo telefone (14) 3235-8421.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal pode, a qualquer momento, retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e que todas as informações prestadas serão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional, Art. 82 do Código de Ética dos Profissionais de Enfermagem. Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, tem direito a indenização conforme Resolução 466/12.

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de _____.

_____
Assinatura do Sujeito da Pesquisa
(ou responsável)

_____
Assinatura do Pesquisador Responsável

Pesquisador Responsável: Lilia Maria von Kostrisch

Endereço Institucional: Rua Silvio Marchione, nº 3-20, Vila Universitária

Cidade: Bauru **Estado:** SP **CEP:** 17012-900 **Telefone:** (14) 32358000, ramal:8137

Email: lmvk@usp.