

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Verônica Oliveira Dias

Leucemia linfoblástica aguda: avaliação da proporção digital 2D:4D e histórico familiar de fissuras orais

Montes Claros  
2017

Verônica Oliveira Dias

Leucemia linfoblástica aguda: avaliação da proporção digital 2D:4D e histórico familiar de fissuras orais

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

Orientador: Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior

Coorientadora: Profa. Dra. Daniella R. B. Martelli

Montes Claros  
2017

D5411 Dias, Verônica Oliveira.  
Leucemia linfoblástica aguda [manuscrito] : avaliação da proporção digital 2D:4D e histórico familiar de fissuras orais / Verônica Oliveira Dias. – 2017.  
124 f. : il.

Inclui Bibliografia.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes,

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde /PPGCS, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior.

Coorientadora: Profa. Dra. Daniella Reis Barbosa Martelli.

1. Leucemia. 2. Genes *homeobox*. 3. Dedos. 4. Fissura palatina. 5. Fissura labial. I. Martelli Júnior, Hercílio. II. Martelli, Daniella Reis Barbosa. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título. V. Título: Avaliação da proporção digital 2D:4D e histórico familiar de fissuras orais.

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: Professor João dos Reis Canela

Vice-reitor: Professor Antônio Alvimar Souza

Pró-reitor de Pesquisa: Professor Vírgilio Mesquita Gomes

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Professora Karen Torres Corrêa Lafetá

Coordenadoria de Iniciação Científica: Professora Sônia Ribeiro Arruda

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Professor Dario Alves de Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: Professor Hercílio Martelli Júnior

Coordenadoria de Pós-graduação *Stricto-sensu*: Professora Maria de Fátima Rocha Maia

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: Professora Marise Fagundes Silveira

Subcoordenador: Professor Luiz Fernando Rezende



CANDIDATA: VERÔNICA OLIVEIRA DIAS

TÍTULO DO TRABALHO: "Leucemia linfoblástica aguda: avaliação da proporção digital 2D:4D e histórico familiar de fissuras orais"

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos clínicos das doenças

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças

**BANCA (TITULARES)**

PROF. DR. HERCÍLIO MARTELLI JÚNIOR - ORIENTADOR

PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. DANIELLA R. B. MARTELLI - COORIENTADORA

PROF. DR. MARCOS JOSÉ BURLE AGUIAR

PROF. DR. DANILLO COSTA RODRIGUES

PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. CARLA SILVANA DE OLIVEIRA E SILVA

PROF. DR. RENATO SOBRAL MONTEIRO JUNIOR

**BANCA (SUPLENTE)**

PROF. DR. MÁRIO SÉRGIO OLIVEIRA SWERTS

PROF<sup>ª</sup>. DR<sup>ª</sup>. SHIRLENE BARBOSA PIMENTEL FERREIRA

PROF. DR. JACKS JORGE JUNIOR

PROF. DR. MÁRIO RODRIGUES DE MELO FILHO

ASSINATURAS

ASSINATURAS

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

APROVADO(A)

REPROVADO(A)

A Júlia e Luísa pelo amor e alegria.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade do aprendizado e por me fortalecer diante das dificuldades.

Ao Professor Hercílio Martelli Júnior, pela paciência, generosidade e pela orientação serena e segura na elaboração deste trabalho. Imensa gratidão e admiração.

À Professora Daniella Reis Barbosa Martelli, por todo o seu auxílio na condução deste trabalho. Obrigada pelas orientações valiosas, sempre direcionadas com carinho e simpatia.

Aos meus pais: José Wellington Gonçalves Dias e Maria Valdívila Oliveira Dias; meus irmãos: Leonardo, Bethânia, Patrícia e Elaine. Agradeço pela torcida e apoio constantes!

À Professora Patrícia Helena Costa Mendes pela contribuição no processo de análise estatística dos estudos.

À Professora Sizina Aguiar e à colega Célia Maia pelas contribuições na coleta dos dados.

Aos alunos da iniciação científica, Maria Luisa, Maria Gabriela, Eloisa, Priscila e João Vitor, pelo interesse e colaboração na realização da pesquisa.

Aos colegas da disciplina de Clínica Infantil, pelo incentivo e apoio.

Ao Centro de Oncologia da Santa Casa e à Universidade Estadual de Montes Claros por permitirem a realização das pesquisas em suas dependências.

Aos pacientes oncológicos da Santa Casa de Montes Claros e aos pacientes das clínicas gerais da Universidade Estadual de Montes Claros. Muito obrigada por consentirem a realização das pesquisas.

Às enfermeiras do Centro de Oncologia da Santa Casa, que tanto colaboraram para a realização deste trabalho, ajudando-me na identificação dos pacientes oncológicos.

Aos colegas do Doutorado Acadêmico em Ciências da Saúde, pelo companheirismo e pela troca de conhecimentos.

Aos professores do Doutorado em Ciências da Saúde, pelos ensinamentos e pela dedicação ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – PPGCS.

Aos Professores Maria José Lages de Oliveira, Lucinéia De Pinho, Edwaldo Barbosa de Souza Júnior, pela disponibilidade de tempo e pelas contribuições dadas a esse trabalho.

À Do Carmo e Pâmela Késia, secretárias do Programa de Pós-graduação pelas informações prestadas e atenção.

À Universidade Estadual de Montes Claros, por conceber o Doutorado em Ciências da Saúde e ofertar um ensino gratuito e de qualidade.

## RESUMO

Aproximadamente 6.000 casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) são diagnosticados anualmente nos Estados Unidos; metade dos casos ocorrem em crianças e adolescentes. No Brasil, a incidência de LLA é de cerca de 40 casos por milhão de pessoas com menos de 15 anos de idade e o pico de incidência entre dois e cinco anos. Estudos associam a ocorrência de leucemia aguda a exposição *in útero* à estrógenos e à expressão alterada de genes *Homeobox* (*HOX*). Estes genes desempenham um papel significativo na hematopoiese e leucemogênese, além de atuarem concomitante na diferenciação dos dedos no período pré-natal e no desenvolvimento craniofacial, particularmente das fissuras labiais e/ou palatinas não síndrômicas (FL/PNS). A relação entre o dedo indicador e o dedo anelar, denominada proporção 2D:4D, tem sido proposto como marcador para a atividade do *HOX* e a exposição hormonal pré-natal. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a relação entre LLA e a proporção 2D:4D; e a associação entre LLA e histórico de FLP/NS, a fim de averiguar a existência de um padrão digital específico relacionado à LLA e verificar se indivíduos diagnosticados com leucemia relatam uma história familiar de FL/PNS mais freqüente do que indivíduos sem a doença. Foram realizados dois estudos caso-controle. No primeiro estudo participaram 129 indivíduos, sendo 43 pacientes diagnosticados com LLA (grupo caso) e 86 indivíduos clinicamente saudáveis (grupo controle). No segundo estudo participaram no total 175 indivíduos, sendo 50 pacientes com LLA (grupo caso) e 125 indivíduos clinicamente saudáveis (grupo controle). A coleta de dados do primeiro estudo envolveu a realização de medições dos comprimentos dos dedos indicadores e anelares das mãos direita e esquerda com a utilização de um paquímetro digital, para o cálculo da proporção 2D:4D, consulta ao prontuário clínico e aplicação de questionários. No segundo estudo foi realizada a aplicação de questionários, para a obtenção de informações relativas à história familiar de FL/PNS em parentes em primeiro grau de pacientes acometidos pela LLA. Subsequentemente, foram realizadas análises estatísticas utilizando o Programa SPSS<sup>®</sup> versão 23.0, adotando-se significância de 5%. Para comparar as médias das proporções 2D:4D entre os grupos, foram utilizados o teste *t* de student para amostras independentes e o teste *Mann-Whitney*. Em relação ao histórico de fissuras orais foram empregados o teste qui-quadrado e o teste exato de Fischer. Pode-se observar que indivíduos do grupo caso apresentaram médias de proporções 2D:4D semelhantes ao grupo controle ( $p > 0,05$ ), o que demonstra a ausência de um padrão digital específico em pacientes acometidos pela LLA. Indivíduos diagnosticados com LLA relataram, mais frequentemente histórico de fissuras orais em parentes em primeiro



grau do que indivíduos clinicamente saudáveis, sugerindo associação entre a LLA e a FL/PNS (qui-quadrado,  $p = 0,02$ ; teste exato de Fisher,  $p = 0,08$ ). Tais resultados sugerem que a proporção 2D:4D não é um marcador para LLA nesta população e a associação entre a FL/PNS e a LLA poderia indicar mecanismos e participação de genes comuns, entre estas duas entidades, como exemplo, os genes da família *HOX*.

Palavras-chave: Leucemia. Genes *homeobox*. Dedos. Fissura palatina. Fissura labial.

## ABSTRACT

Approximately 6,000 cases of acute lymphoblastic leukemia (ALL) are diagnosed every year in the USA, over half of which occur in children and adolescents. . In Brazil, the incidence of LLA is about 40 cases per million people under 15 years of age and the peak incidence between two and five years. Studies associate the occurrence of acute leukemia with *in utero* exposure to estrogen and the altered expression of Homeobox (*HOX*) genes. These genes play a significant role in hematopoiesis and leukemogenesis, in addition to acting concomitantly in the differentiation of the fingers in the prenatal period and in craniofacial development, particularly of non-syndromic cleft lip and palate (NSCL/P). The ratio between the index finger and the ring finger, known as the 2D:4D ratio, has been proposed as a marker for *HOX* activity and prenatal hormone exposure. The present study therefore investigated the relationship between ALL and 2D:4D ratio and history of NSCL/P, to ascertain the existence of a specific digital pattern related to ALL, and to verify if families with individuals diagnosed with leukemia more frequently report a family history of NSCL/P than families without cases of the disease. Two case-control studies were performed. In the first study 129 individuals participated, being 43 patients diagnosed with ALL (case group) and 86 clinically healthy individuals (control group). In the second study, a total of 175 individuals participated, 50 patients with ALL (case group) and 125 clinically healthy individuals (control group). The data collection of the first study involved the measuring of the lengths of the index and ring fingers of the right and left hands using a digital caliper to calculate the 2D:4D ratio, verification of the clinical file and application of questionnaires. In the second study, questionnaires were applied to obtain information about family history of NSCL/P in first-degree relatives of patients affected by ALL. Statistical analysis was subsequently performed using the SPSS® Version 23.0 for Windows® program, adopting a significance of 5%. To compare the mean 2D:4D ratios between the groups, the student's t-test for independent samples and the Mann-Whitney test were used, while the chi-square test and Fisher's exact test were used in relation to the history of oral clefts. It can be observed that individuals from the case group had very similar mean 2D:4D ratios to the control group ( $p > 0.05$ ), revealing the absence of a specific digital pattern in patients affected by ALL. Individuals diagnosed with leukemia report more frequently a history of oral clefts in families than clinically healthy individuals (chi-square,  $p = 0.02$ ; Fisher's exact test,  $p = 0.08$ ) suggesting an association between NSCL/P and ALL. These results suggest that the 2D: 4D ratio is not a marker for this

type of cancer in this population and the association between NSCL/P and ALL could indicate mechanisms and participation of common genes, such as HOX family genes .

Keywords: Leukemia. Genes Homeobox. Fingers. Cleft palate. Cleft lip.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Proporção 2D:4D - Razão entre o comprimento do dedo indicador em relação ao comprimento do dedo anelar .....	17
Figura 2 - Base do desenvolvimento da proporção 2D:4D e elucidação do dimorfismo sexual .....	27
Figura 3 - Mãos adultas humanas indicando o dimorfismo sexual da proporção 2D:4D.....	28
Figura 4 - Método direto de mensuração da razão 2D:4D .....	31
Figura 5 - Método indireto de medição da razão 2D:4D.....	32
Figura 6 - Método de automedição da proporção 2D:4D.....	32
Figura 7 - Fissuras de lábio e/ou palato.....	34
Figura 8 - Paquímetro digital.....	42
Figura 9 - Paquímetro posicionado nos pontos de referência para medir a proporção 2D:4D.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Receptor de andrógeno
AXIN2	<i>Axin-related protein</i>
BMPs	Proteínas osteomorfogênicas
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGIL	<i>European Group for the Immunological Characterization of Leukemias</i>
EP	Estrogéno pré-natal
ER	Receptor de estrogéno
FGF	<i>Fibroblast growth factors</i>
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
FL	Fissura Labial
FP	Fissura Palatina
FL/P	Fissura lábiais e/ou palatinas
FL/PNS	Fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas
HOX	<i>Homeobox</i>
HOXA	<i>Homeobox A</i>
HOXA9	<i>Homeobox A9</i>
HOXD	<i>Homeobox D</i>
HOXD1	<i>Homeobox D1</i>
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
ICC	Coefficiente de Correlação Intraclasse
IGF-I	<i>Insulin-like growth</i>
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfoblástica Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LSC	<i>Leukemic Stem Cell</i>
L2D:4D	Razão 2D:4D da mão esquerda
MEIS1	<i>Meis Homeobox 1</i>
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia</i>
MSX1	<i>Muscle segment homeobox 1</i>

R2D:4D	Razão 2D:4D da mão direita
SPSS®	Programa <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGF- $\alpha$	<i>Transforming growth factor <math>\alpha</math></i>
TP	Testosterona pré-natal
2D	Comprimento dedo indicador das mãos
4D	Comprimento do dedo anelar das mãos
2D:4D	Razão entre o dedo indicador em relação ao anelar

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Ojetivos específicos.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 Leucemia.....	20
3.1.1 Leucemia linfoblástica aguda.....	21
3.1.2 Classificação da leucemia linfoblástica aguda.....	22
3.1.3 Fatores etiológicos.....	23
3.2 Proporção 2D:4D.....	25
3.2.1 Proporção 2D:4D e Leucemia linfoblástica aguda.....	28
3.2.2 Métodos de medição da proporção 2D4D.....	30
3.3 Características gerais das FL/PNS e a relação com a LLA.....	33
4 METODOLOGIA.....	39
5 PRODUTOS.....	46
5.1 Artigo 1: <i>Association between hand digit ratio (2D:4D) and acute lymphoblastic leukemia</i> .....	47
5.2 Artigo 2: <i>Risk of oral clefts in relatives of patients with acute lymphoblastic leukemia</i> .....	63
6 CONCLUSÕES.....	69
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICES.....	80
APÊNDICE A – Instrumento de Coleta de Dados.....	80
APÊNDICE B – Figura padrão para identificação das fissuras labial/palatinas apresentadas nas entrevistas clínicas.....	83
APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participação em Pesquisa.....	84
APÊNDICE D – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para Participação em Pesquisa.....	85
ANEXOS.....	86

ANEXO A - Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Montes Claros.....	86
ANEXO B - Normas do Periódico <i>Early Human Development</i> .....	89
ANEXO C - Normas do Periódico <i>International Journal of Paediatric Dentistry</i>	111



## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas compreendem um grupo de doenças de natureza multifatorial, com participação de fatores genéticos e ambientais. Diferentes estudos têm sido realizados para reduzir a incidência dessas neoplasias, particularmente na compreensão dos fatores ambientais mutagênicos e o estudo de genes susceptíveis, por meio de análises polimórficas e mutacionais (NUNES *et al.*, 2003; TAIOLI *et al.*, 2010). Dentre as neoplasias malignas a leucemia linfoblástica aguda (LLA) destaca-se por representar uma das principais causas de morte entre crianças e adolescentes (HUNGER e MULLIGHAN, 2015).

Embora possa ocorrer em qualquer idade, a LLA tem incidência maior em crianças correspondendo a cerca de um quarto de todos os distúrbios malignos nessa faixa etária e a 80% de todas as leucemias que ocorrem até os 15 anos de idade (PUI *et al.*, 2008; HUNGER e MULLIGHAN, 2015). Seu pico de incidência ocorre em crianças entre dois e cinco anos de idade, sendo mais comum nos leucodermas e tem uma discreta predominância no sexo masculino (LIM *et al.*, 2014). A ocorrência da LLA é pouco frequente em adultos e parece haver um aumento da incidência em indivíduos com mais de 50 anos sendo que há um pior prognóstico com o aumento da idade (KEBRIAIEI e LARSON, 2003).

A idade precoce de desenvolvimento da LLA sugere que a sua etiologia inicia muito cedo, possivelmente no período pré-natal (GREAVES, 2005). As taxas aumentadas da doença têm sido associadas à exposição a radiação e a certos produtos químicos, mas essas associações explicam apenas uma minoria dos casos (HUNGER e MULLIGHAN, 2015). Embora estudos epidemiológicos assinalem outros fatores associados com a doença, sua etiologia permanece controversa. Entretanto, é provável que o desenvolvimento da LLA resulte da interação entre múltiplos processos, incluindo herança genética e exposições a diferentes agentes tanto na vida intrauterina como após o nascimento (GREAVES, 2006; BELSON *et al.*, 2007).

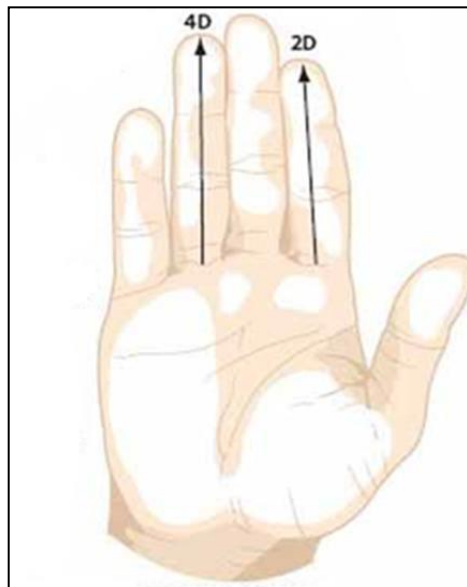
Entre os agentes expostos na vida intrauterina, a exposição hormonal pré-natal tem sido associada à leucemia aguda na infância (BAIK *et al.*, 2005; POMBO-DE-OLIVEIRA e KOIFMAN, 2006). Em relação aos fatores genéticos, observa-se a expressão alterada de genes da família *Homeobox (HOX)*, importantes para a proliferação e a diferenciação das

células hematopoiéticas (ARGIROPOULOS e HUMPHRIES, 2007; ADAMAKI *et al.*, 2015).

*HOX* são genes regulatórios que codificam proteínas nucleares e agem como fatores de transcrição durante o crescimento normal das células, mas quando desregulados estão envolvidos em diversas malformações e até mesmo na oncogênese (NUNES *et al.*, 2003). Além disso, atuam na formação e diferenciação dos dedos (MANNING *et al.*, 2003).

Sabe-se hoje que a proporção entre o comprimento do segundo dedo das mãos (2D - dedo indicador) em relação ao comprimento do quarto dedo (4D - dedo anelar) denominada razão 2D:4D, ou comprimento digital (*finger length*) (Figura 1), é estabelecida na vida intrauterina e tem recebido bastante atenção nos últimos anos por ter sido proposta como marcador putativo para exposição hormonal pré-natal, bem como para expressão de *HOX* e do receptor de andrógeno (*AR*) (MANNING *et al.*, 2003; HOPP e JORGE, 2011). A razão 2D:4D é negativamente correlacionada à testosterona pré-natal (TP) e positivamente ao estrógeno pré-natal (EP) (LUTCHMAYA *et al.*, 2004).

Figura 1 - Proporção 2D:4D – Razão entre o comprimento do dedo indicador em relação ao comprimento do dedo anelar



Fonte:<http://www.handfacts.wordpress.com>

Como tem sido proposto que a exposição hormonal na vida intrauterina (BAIK *et al.*, 2005; POMBO-DE-OLIVEIRA e KOIFMAN, 2006) e a expressão alterada de *HOX* (ADAMAKI *et al.*, 2015) estão associadas à ocorrência de leucemia aguda na infância, é possível que o comprimento digital seja preditor para o desenvolvimento dessa neoplasia.

Além disso, os cânceres acompanham muitas malformações congênitas. Nesse contexto, investigar também a relação entre malformações congênitas e malignidades é importante, pois é proposto que elas podem ter causas comuns (TAIOLI *et al.*, 2010). Dentre elas, as fissuras labiais e/ou palatinas (FL/P) destacam-se por representarem as anomalias craniofaciais mais comuns nos seres humanos (DIXON *et al.*, 2011).

Com os estudos, identificaram-se alguns genes em indivíduos com fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas (FL/PNS) que estariam envolvidos na etiologia de certos tipos de cânceres, como o câncer gástrico e o colorretal que foram elucidados nos mecanismos de gênese das FL/PNS e que poderiam ser importantes determinantes de riscos para sua ocorrência (LIDRAL *et al.*, 2008; BIRNBAUM *et al.*, 2009). Tal fato, pode ser observado pela maior incidência de câncer para familiares de portadores de fissuras orais do que para a população em geral. Essa associação poderia indicar uma origem comum para essas doenças que estaria na participação de alguns genes (NISHI *et al.*, 2000). Seguindo esta linha de estudo, o *HOX* se faz importante no desenvolvimento craniofacial e as alterações na sua expressão são associadas à ocorrência de FL/PNS (BEATY *et al.*, 2006) e à leucemia aguda (ADAMAKI *et al.*, 2015).

Tendo em vista esses fatores, este estudo investigou a relação entre a LLA e a proporção 2D:4D e LLA e o histórico de FL/PNS, a fim de averiguar a existência de um padrão digital específico relacionado à LLA e verificar se indivíduos diagnosticados com LLA relatam uma história familiar de FL/PNS mais frequente do que indivíduos clinicamente saudáveis.

As hipóteses deste trabalho referem-se a: 1) indivíduos com LLA possuem padrão digital diferente de indivíduos sem a doença, sendo este padrão ainda desconhecido, uma vez que este estudo é pioneiro na investigação dessa associação; 2) indivíduos diagnosticados com LLA terão uma frequência maior de FL/PNS em parentes em primeiro grau do que indivíduos clinicamente saudáveis.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a associação entre a leucemia linfoblástica aguda e a proporção digital 2D:4D e a leucemia linfoblástica aguda e a ocorrência familiar de fissuras orais não sindrômicas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a existência de um padrão digital específico relacionado à leucemia linfoblástica aguda.
- Identificar a frequência familiar de fissura labial e/ou palatina não sindrômica em parentes em primeiro grau de pacientes com leucemia linfoblástica aguda.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Leucemia

O sistema hematopoiético é fundamental à manutenção da vida. O equilíbrio entre a produção e a apoptose das células do sangue e do sistema imunológico, bem como a manutenção da composição do plasma, é vital aos processos de oxigenação e de nutrição dos tecidos e aos processos de defesa e de homeostase do organismo (GUIMARÃES, 2015). Na hematopoiese normal a célula tronco hematopoiética (HSC, do inglês *Hematopoietic Stem Cell*) dá origem às células precursoras multipotentes que originam os precursores linfóides e mielóides oligopotentes (BENE *et al.*, 1995). A hematopoiese pode ser comprometida pelo acúmulo sequencial de múltiplos eventos genéticos e epigenéticos que desencadeiam a desregulação da produção e a função dos glóbulos brancos em um processo conhecido como leucemogênese (NGUYEN *et al.*, 2012; GUIMARÃES, 2015).

A leucemia é uma doença heterogênea, que se origina da proliferação descontrolada de células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea. Estas células são capazes de se multiplicarem indefinidamente por auto-renovação, levando à produção de precursores hematopoiéticos malignos e pouco diferenciados. A ocorrência de anomalias genéticas nestas células precursoras compromete todo o processo normal de maturação. Como consequência, há um acúmulo de células jovens (blastos) anormais na medula óssea prejudicando ou impedindo a produção de leucócitos, eritrócitos e plaquetas, o que leva à ocorrência de infecções, anemia e hemorragias constantes (HOFFBRAND *et al.*, 2008).

A classificação geral agrupa as leucemias de acordo com a linhagem acometida e a progressão da doença em: 1) leucemia linfoblástica aguda (LLA), 2) leucemia linfoblástica crônica (LLC), 3) leucemia mielóide aguda (LMA) e 4) leucemia mielóide crônica (LMC). Conforme esta classificação, as leucemias linfóides atingem as células linfóides e as mielóides atingem as linhagens mielóides (SWERDLOW *et al.*, 2008). Além disso, a principal diferença entre as formas aguda e crônica é que as leucemias agudas são doenças de progressão rápida em que as células perdem a capacidade de se diferenciarem, o que resulta no acúmulo de células imaturas denominadas blastos, com função e proliferação celular anormais, enquanto que nas

leucemias crônicas há um acúmulo de células diferenciadas que conseguem realizar algumas funções no organismo. Portanto, a doença tem uma progressão mais lenta (HOFFBRAND *et al.*, 2008).

### 3.1.1 Leucemia linfoblástica aguda

A LLA é uma desordem maligna que origina de uma célula precursora do sistema linfopoiético comprometida para o desenvolvimento da linhagem de linfócitos B ou T. A aquisição pela célula precursora de uma série de anormalidades genéticas, altera seu processo normal de maturação, conduzindo a parada na diferenciação celular e a vantagem proliferativa do clone leucêmico sobre as células do tecido hematopoiético (PUI *et al.*, 2008). Sabe-se, que a célula de origem pode consistir tanto na célula HSC como em células progenitoras que sofrem mutações e adquirem capacidade de auto-renovação. A HSC passa então a ser chamada de célula-tronco leucêmica (LSC, do inglês *Leukemic stem cell*) (PUI *et al.*, 2008).

Aproximadamente 6.000 casos de LLA são diagnosticados anualmente nos Estados Unidos; metade dos casos ocorrem em crianças e adolescentes, sendo a incidência cerca de 30 casos por milhão de pessoas com menos de 20 anos de idade e varia significativamente de acordo com raça e grupo étnico: 14,8 em negros, 35,6 em brancos e 40,9 em hispânicos ((HOWLANDER, 2014; LIM *et al.*, 2014). No Brasil, a incidência de LLA é de cerca de 40 casos por milhão de pessoas com menos de 15 anos de idade e o pico de incidência entre dois e cinco anos (DE SOUZA REIS *et al.*, 2011; INCA, 2016).

A estimativa para o ano de 2016, apontou para a ocorrência de aproximadamente 5.540 casos novos de leucemia em homens e 4.530 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,63 casos novos a cada 100 mil homens e 4,38 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).

Atualmente, mais de 80% das crianças com LLA são curadas, assim como cerca de 50% dos adultos jovens. A chance de cura é expressiva, pois a LLA responde muito bem à quimioterapia específica (HUNGER e MULLIGHAN, 2015).

### 3.1.2 Classificação da Leucemia linfoblástica aguda

As LLA são classificadas de acordo com o aspecto citomorfológico, citoquímico, imunofenotípico, citogenético e genético-molecular. Esses dados permitem a estratificação prognóstica, asseguram a escolha da terapia mais adequada e auxiliam na monitoração após o tratamento (HUNGER e MULLIGHAN, 2015).

O Grupo Europeu de Classificação Imunológica das Leucemias (EGIL, do inglês *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*) simplificou a caracterização das LLA, padronizando as diferentes nomenclaturas utilizadas por diferentes pesquisadores na área de imunofenotipagem celular. As LLA foram classificadas na categoria de neoplasias de linhagem B ou T, com a denominação de leucemia linfoblástica B ou T (LLA B ou T). As LLA de células precursoras B são subdivididas em 4 estágios: B-I (LA pró-B), B-II (LLA B comum), B-III (LLA pré-B) e B-IV (LLA B madura) do fenótipo mais imaturo para o mais maduro. As células da linhagem T são caracterizadas em três estágios de acordo com os antígenos de superfície celular: pré-T (T-I); T-intermediário (T-II) e T-maduro (T-III). A LLA de linhagem T apresenta menor incidência, e ocorre mais frequentemente em adultos em relação às crianças (BENE *et al.*, 1995; BENE, 2005).

Na LLA, a imunofenotipagem é mandatória para a definição da origem celular T ou B, além de identificar os subtipos imunofenotípicos que são de relevância no prognóstico e no tratamento dos pacientes, sendo a que maioria das LLA é de linhagem B, tanto em crianças como em adultos (BENE, 2005).

### 3.1.3 Fatores etiológicos

Apesar dos avanços obtidos nas técnicas de diagnóstico e tratamento, ainda não estão bem claros os aspectos etiológicos da LLA, entretanto acredita-se que a transformação leucêmica pode envolver interações complexas entre diversos fatores genéticos, hereditários, imunológicos, epigenéticos e ambientais (GREAVES, 2006; BELSON *et al.*, 2007; HUNGER e MULLIGHAN, 2015).

Alguns fatores têm sido associados à leucemogênese como: radiação ionizante, drogas antineoplásicas, constituição genética e imunológica e exposição à alguns vírus (BELSON *et al.*, 2007; HUNGER e MULLIGHAN, 2015). A radiação ionizante é um dos principais fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento da leucemia principalmente quando a exposição ocorre durante a vida intra-uterina ou durante a primeira infância (GREAVES, 2005).

Além dos fatores de riscos ambientais, algumas anomalias cromossômicas constitucionais estão associadas a uma maior susceptibilidade à LLA, como síndrome de Down, síndrome de Bloom, síndrome de Nijmegen, anemia de Fanconi e ataxia-telangiectasia (HUNGER e MULLIGHAN, 2015).

A ocorrência da LLA em fase precoce da vida sugere que eventos ou exposições ambientais que ocorrem durante a infância, a gestação e até mesmo antes da concepção poderiam contribuir para o seu desenvolvimento (GREAVES, 2005; BELSON *et al.*, 2007).

Entre os fatores pré-natais, estudos têm sugerido que a exposição hormonal durante a gravidez pode ser um fator etiológico para o desenvolvimento de leucemia aguda (BAIK *et al.*, 2005; POMBO-DE-OLIVEIRA e KOIFMAN, 2006; SCHNYDER *et al.*, 2009).

Baik *et al.* (2005) apontaram que os hormônios de crescimento, como fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I do inglês *Insulin-like growth factor*) e hormônios esteróides (estrógeno e testosterona) na vida intrauterina, estão positivamente associados ao número total de células-tronco e, por extensão, número total de células hematopoiéticas imaturas replicadas e, eventualmente, com risco de transformação em células leucêmicas.

Posteriormente, Pombo-de-Oliveira e Koifman (2006) em um estudo multicêntrico de caso-controle observaram uma forte associação entre a leucemia aguda e a exposição ao estrógeno durante a gravidez.

Schnyder *et al.* (2009) concluíram que concentrações de estrógeno durante a gravidez pode induzir a aberrações do gene *Mixed Lineage Leukemia (MLL)* e pode assim ser um dos primeiros eventos de leucemogênese que ocorre *in útero*.



A LLA se destaca como um exemplo de doença que apresenta alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais altamente consistentes e específicas, envolvendo genes que, uma vez alterados qualitativa ou quantitativamente, atuam como fatores de iniciação e progressão neoplásicas (HUNGER e MULLIGHAN, 2015).

Vários fatores genéticos estão associados com um risco aumentado de LLA, mas a maioria dos pacientes não possui os fatores etiológicos reconhecidos (GREAVES, 2006; HUNGER e MULLIGHAN, 2015). Muitos genes foram identificados por estarem rompidos em consequência das translocações cromossômicas encontradas nas leucemias. Pode-se citar como exemplo os fatores de transcrição quiméricos, originados de translocações cromossômicas, que ativam diversas cascatas transcricionais que, pelo menos em parte, convergem para modificar o padrão de expressão normal de membros da importante família *HOX*. Os fatores de transcrição *HOX* se ligam ao DNA e regulam genes envolvidos tanto na diferenciação do embrião como da célula-tronco hematopoiética; sendo também importantes na auto-renovação e na proliferação das células hematopoiéticas (BUSKE e HUMPHRIES, 2000).

Os genes *HOX* foram primeiramente descritos em *Drosophila*, e são considerados genes mestres do desenvolvimento que especificam a identidade posicional das células no embrião em desenvolvimento. Em mamíferos, os genes *HOX* são distribuídos em quatro *clusters* (*HOX A, B, C e D*), e totalizam 39 genes. Os mecanismos que dirigem sua expressão gênica são conservados há 600 milhões de anos (GOODMAN e SCAMBLER, 2001).

Estudos sugerem que as expressões desreguladas de genes da família *HOX* estão envolvidos na transformação leucêmica (ARGIROPOULOS e HUMPHRIES, 2007; ADAMAKI *et al.*, 2015). Adamaki *et al.* (2015) observaram que a superexpressão de *homeobox A9 (HOXA9)* e *Meis homeobox 1 (MEIS1)* estão associados a uma variedade de subtipos leucêmicos, incluindo vários estágios de maturação da LLA B. Além disso, mostraram que a superexpressão de *HOXA9* e *MEIS1* estão inversamente correlacionadas com a recaída e a sobrevida, de modo que estes genes podem se tornarem marcadores preditivos úteis do curso clínico de leucemias agudas pediátricas. Os *HOX*, além de atuarem no controle do crescimento celular de vários órgãos, contribuem para o desenvolvimento e a diferenciação

dos dedos, principalmente o *homeobox A (HOXA)* e o *homeobox D (HOXD)* (MANNING *et al.*, 2003).

A etiologia da LLA ainda não foi completamente esclarecida, mas evidências apontam para origem multifatorial. Pesquisas envolvendo receptores e marcadores diversos estão sendo desenvolvidas, porém ainda existe vasto campo a ser explorado para o esclarecimento da etiologia dessa neoplasia (HUNGER e MULLIGHAN, 2015).

### 3.2 Proporção 2D:4D

A razão entre o comprimento do segundo dedo das mãos (2D - dedo indicador) em relação ao comprimento do quarto dedo (4D – dedo anelar) também denominada proporção 2D:4D, tem sido considerada como um marcador putativo para estudar tanto características comportamentais, quanto psicológicas e a susceptibilidade de indivíduos a várias doenças, principalmente aquelas que apresentam diferenças sexuais em relação à ocorrência, progressão e prognóstico (HOPP e JORGE, 2011; MENDES *et al.*, 2016).

A proporção 2D:4D tem sido bastante estudada nos últimos anos por ter sido proposta como marcador para expressão de *HOX*, de *AR*, bem como exposição hormonal pré-natal, notadamente testosterona e estrógeno (MANNING *et al.*, 1998; LUTCHMAYA *et al.*, 2004; HOPP e JORGE, 2011; MENDES *et al.*, 2016).

Ecker (1875) reportou pela primeira vez, que os dedos anelar e indicador podem apresentar três padrões de simetria aproximada - o dedo indicador pode ser maior do que o dedo anelar ( $2D > 4D$  ou 2D:4D alto) e vice-versa ( $2D < 4D$  ou 2D:4D baixo) ou ambos terem comprimentos similares ( $2D = 4D$ ). Esse estudo contrariou observações anteriores de que os dedos apresentavam sempre o mesmo padrão de simetria, com o dedo anelar sempre maior do que o indicador e abriu campo para que se buscasse entender a razão desta relação (HOPP, 2012).

A proporção entre os dedos indicador e anelar é estabelecida na vida intrauterina, mais precisamente na 13ª semana de gestação (GARN *et al.*, 1975), e já existem evidências de que

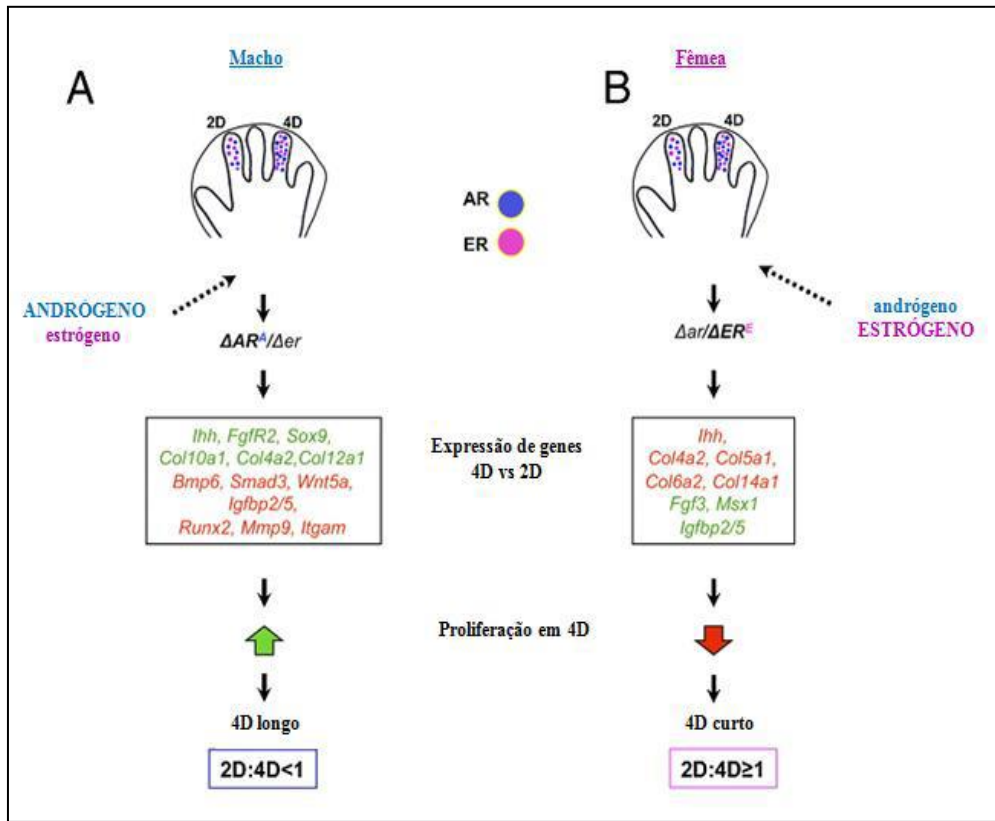
a proporção 2D:4D não está relacionada às concentrações de hormônios sexuais presentes na circulação sanguínea e na saliva do adulto, o que implica que o comprimento digital reflete rigorosamente a exposição hormonal *in utero* (HÖNEKOPP *et al.*, 2007; MULLER *et al.*, 2011).

Desde 1998, ano em que John Manning iniciou os primeiros estudos sobre o comprimento digital, variáveis relacionadas ao risco, à prevalência, à severidade, à idade de apresentação, à resposta a tratamentos terapêuticos e prognóstico de diversas afecções têm sido associadas à proporção 2D:4D da mão direita (R - *Right* 2D:4D ou R2D:4D) e/ou da mão esquerda (L - *Left* 2D:4D ou L2D:4D) (MANNING e BUNDRED, 2000). Mais recentemente, foi sugerido um marcador derivado da proporção 2D:4D, que consiste na diferença entre R2D:4D e L2D:4D, representado pelas siglas DR-L ou  $\Delta$ R-L (MULLER *et al.*, 2012).

Zheng e Cohn (2011) esclareceram o mecanismo de desenvolvimento dos dedos ao descreverem que andrógenos e estrógenos regulam uma rede de genes que controlam a proliferação dos condrócitos. Nesse estudo realizado em animais, confirmou que a proporção digital é estabelecida pelo equilíbrio entre a exposição e a sensibilidade aos hormônios estrógeno e testosterona.

O equilíbrio entre a exposição aos dois hormônios sexuais gera diferenças na proporção entre os dedos anelar e indicador, correlacionada negativamente a exposição à testosterona e positivamente à expressão ao estrógeno. Assim, quanto maior for a exposição ao andrógeno, maior será o dedo anelar em relação ao dedo indicador, diminuindo a proporção digital. O contrário é verdadeiro, quanto maior for a exposição ao estrógeno, isto é, dedo anelar menor que o dedo indicador, maior a proporção digital. Este estudo observou ainda um maior número de receptores de andrógeno e estrógeno em 4D quando comparado a 2D, e que a ativação dos condrócitos acontece principalmente sobre as falanges proximal e média de 4D. Devido a esta influência, homens tendem a apresentar baixa proporção 2D:4D (dedo indicador menor do que o dedo anelar) e mulheres tendem a apresentar proporção aproximadamente igual entre os dois dedos ou o indicador levemente maior que o anelar (Figura 2) (ZHENG e COHN, 2011).

Figura 2: Base do desenvolvimento da proporção 2D:4D e elucidação do dimorfismo sexual.



Receptores de andrógenos (AR – círculo azul) e receptores de estrógenos (ER – círculo rosa) estão presentes em dedos de embriões machos e fêmeas, com maiores níveis observados em 4D. ZHENG e COHN (2011).

O padrão de dimorfismo sexual característico da proporção 2D:4D pode ser observado aos dois anos de idade e mantém-se inalterado independente da faixa etária, mesmo que comprimento digital sofra alteração durante o período de crescimento humano (Figura 3) (MCINTYRE *et al.*, 2005; GILLAM *et al.*, 2008). Além disso, a proporção 2D:4D varia entre diferentes grupos étnicos/raciais, observando-se 2D:4D mais altos em indivíduos da raça branca, árabes e asiáticos e um menor 2D:4D em chineses e indivíduos da raça negra (MANNING *et al.*, 2004).

Figura 3: Mãos adultas humanas indicando o dimorfismo sexual da proporção 2D:4D



Fonte: ZHENG e COHN (2011).

Desde que os métodos para a aferição dos níveis pré-natais de hormônios sexuais como a obtenção de sangue de fetos ainda no útero, líquido amniótico, sangue do cordão umbilical ou sangue materno são difíceis de realizar (MCINTYRE *et al.*, 2006), o método de análise da proporção 2D:4D, proposto por Manning (MANNING *et al.*, 1998), tem sido amplamente utilizado como um biomarcador não invasivo e retrospectivo da exposição hormonal pré-natal. A importância do mesmo está ligada ao fato de que a ação de tais hormônios está relacionada à etiologia de várias doenças ou condições (HOPP *et al.*, 2014), sendo a razão 2D:4D preditiva para diversas situações, podendo ser utilizados no diagnóstico, no prognóstico e em intervenções precoces de estilo de vida que podem retardar o aparecimento da doença ou facilitar a sua detecção precoce (MANNING e BUNDRED, 2000).

### 3.2.1 Proporção 2D:4D e Leucemia linfoblástica aguda

Um importante e recente campo que tem sido explorado na pesquisa sobre 2D:4D refere-se à sua correlação com diferentes tipos de cânceres, apontando o comprimento digital como um marcador para o risco, a prevalência e a gravidade de diversas neoplasias (HOPP *et al.*, 2014; MENDES *et al.*, 2016). Até o presente momento, vários tipos de cânceres já foram correlacionados à razão 2D:4D sendo que o câncer de próstata e mama foram os mais

associadas ao comprimento digital. A tabela (1) a seguir apresenta os estudos já conduzidos nesta temática.

Tabela 1: Estudos mostrando a associação entre a proporção 2D:4D e cânceres

	Baixo 2D:4D	Alto 2D:4D
Manning e Leinster (2001)		Maior risco para câncer de mama
Jung et al. (2010)	Maior risco para câncer de próstata	
Hopp e Jorge (2011)		Maior risco para câncer oral em homens
Muller et al. (2011)	Maior risco para câncer de próstata	
Rahman et al. (2011)	Maior risco para câncer de próstata	
Oh et al. (2012)	Maior risco para câncer de próstata	
Hopp e Jorge (2012)	Maior risco para câncer de próstata	
Muller et al. (2012)		Maior risco para câncer de mama
Hopp et al. (2013)		Maior risco para câncer gástrico
Hong et al. (2014)		Maior risco para câncer de mama
Hopp et al. (2015)		Maior risco para câncer colorretal
Mendes et al. (2016)	Maior risco para câncer de próstata	
Bunevicius et al. (2016)	Maior risco para câncer cerebral	
Gonçalves et al. (2017)		Maior risco para câncer gástrico

Em geral, a plausibilidade da relação 2D:4D versus câncer baseia-se em duas premissas. A primeira é que a exposição hormonal pré-natal tem sido implicada na etiologia de inúmeros cânceres, como câncer de mama e de próstata (POTISCHMAN *et al.*, 2005), e a segunda, refere-se à ação concomitante de genes que atuam tanto no controle e na diferenciação dos dedos no período intrauterino, como em eventos relacionados à carcinogênese de diversos

tumores, principalmente àqueles que mostram diferenças sexuais em relação à ocorrência, à progressão e ao prognóstico (HOPP e JORGE, 2012; MENDES *et al.*, 2016).

Acredita-se que o comprimento digital seja também influenciado pelos genes da família *HOX*, principalmente *HOXA* e *HOXD*, sendo ativados e desativados pela testosterona e pelo estrogênio pré-natal (MANNING *et al.*, 2003). Tais genes, além de contribuírem para o desenvolvimento e a diferenciação dos dedos, desempenham um papel significativo na proliferação e na diferenciação das células hematopoiéticas e alterações na sua expressão são associadas à ocorrência de leucemia aguda na infância (ARGIROPOULOS e HUMPHRIES, 2007; ADAMAKI *et al.*, 2015).

Evidências crescentes apontam para o papel do *HOX* no aparecimento de câncer. Alterações na expressão desse gene foram observadas em tumores do sistema genital, dos rins, da pele, do sistema digestivo (MANNING *et al.*, 2003), da mama (MANNING e LEINSTER, 2001; JESCHKE *et al.*, 2012), da próstata (CHUA *et al.*, 2010) e em leucemias agudas (ADAMAKI *et al.*, 2015).

A associação entre a proporção 2D:4D e a LLA está relacionada ao fato de que estudos sinalizam que a exposição *in útero* à estrógenos está fortemente associada a leucemogênese (POMBO-DE-OLIVEIRA e KOIFMAN, 2008) e a ação dos genes *HOX*, notadamente *HOXA*, que além de atuarem no desenvolvimento dos dedos, desempenham papéis essenciais tanto na hematopoiese quanto na leucemogênese (ARGIROPOULOS e HUMPHRIES, 2007; ADAMAKI *et al.*, 2015).

A metodologia de estudos envolvendo a proporção 2D:4D tem sido utilizada para investigar a relação deste marcador putativo com diversas doenças (MANNING *et al.*, 2003; VORACEK *et al.*, 2007). No entanto, até o momento não existem trabalhos na literatura correlacionando a proporção 2D:4D à leucemia.

### 3.2.2 Métodos de medição da proporção 2D:4D

Diferentes métodos têm sido empregados para a verificação da proporção 2D:4D em inúmeras publicações realizadas desde 1998. A medição do comprimento dos dedos pode ser feita através do método direto por meio de paquímetros convencionais ou digitais, régua

milimetradas diretamente sobre as mãos dos indivíduos (Figura 4) ou de forma indireta, a partir da obtenção de imagens fotografadas ou escaneadas das mãos e, posterior, análise do comprimento dos dedos, através de régua, paquímetros ou *softwares* de computador (Figura 5). Outra maneira relatada é a automedição dos pacientes, em que eles mesmos definem seu padrão digital, comparando-o com figuras indicativas das diferentes proporções (Figura 6) (VORACEK *et al.*, 2007, KEMPER e SCHWERDTFEGER, 2009). Não há método universalmente aceito para a medição dos dedos, no entanto parece haver uma tendência do método indireto obter médias da proporção 2D:4D menores quando comparadas à técnica direta (MANNING *et al.*, 2005). Em uma recente revisão da literatura, o método direto é apontado como a melhor escolha quando um pequeno número de participantes estiverem envolvidos e haja um tempo adequado para a medição (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Outra importante diferença metodológica observada em estudos 2D:4D refere-se à escolha da mão para análise. Em geral, a maioria das pesquisas avaliam apenas a mão direita, uma vez que existem evidências de que esta apresenta maior responsividade aos hormônios sexuais, quando comparado à mão esquerda (HÖNEKOPP e WATSON, 2010). Pesquisas mais recentes tem buscado avaliar um marcador secundário: DR-L ou  $\Delta R-L$ , que corresponde à diferença entre as proporções da mão direita e da esquerda, e reflete a sensibilidade aos hormônios sexuais, sendo proposto que baixo DR-L está associado a uma maior exposição à testosterona intrauterina e, conseqüentemente, à menor exposição ao estrógeno (MCINTYRE *et al.*, 2006; BREEDLOVE, 2010).

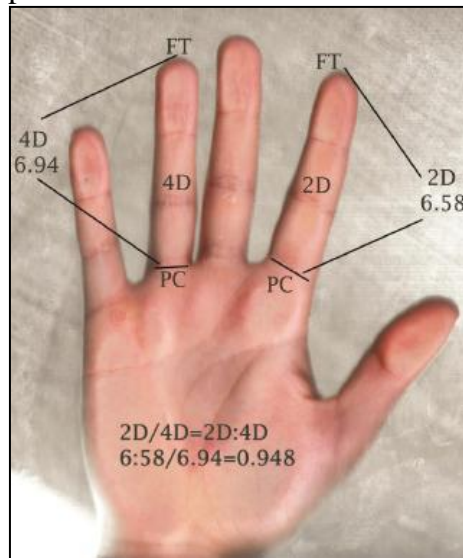
Figura 4. Método direto de mensuração da razão 2D:4D, a partir do uso de paquímetro digital



Fonte: JUNG *et al.* (2010)

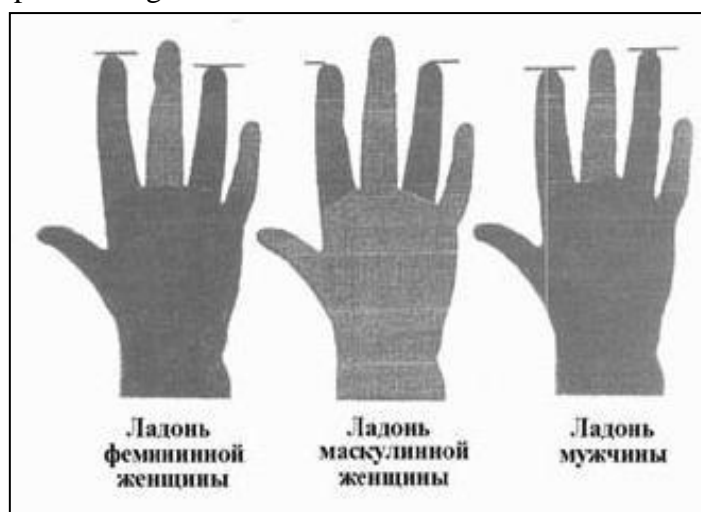


Figura 5. Método indireto de medição da razão 2D:4D, em que a mão foi escaneada e, em seguida, foi realizada a medição dos dedos a partir do uso de softwares



Fonte: NEYSE e BRAÑAS-GARZA (2014).

Figura 6. Método de automedição da proporção 2D:4D, em que indivíduos comparam seu comprimento digital com figuras indicativas dos três padrões digitais



Fonte: <http://www.lib.spotedu.ru>.

### 3.3 Características gerais das FL/PNS e a relação com a LLA

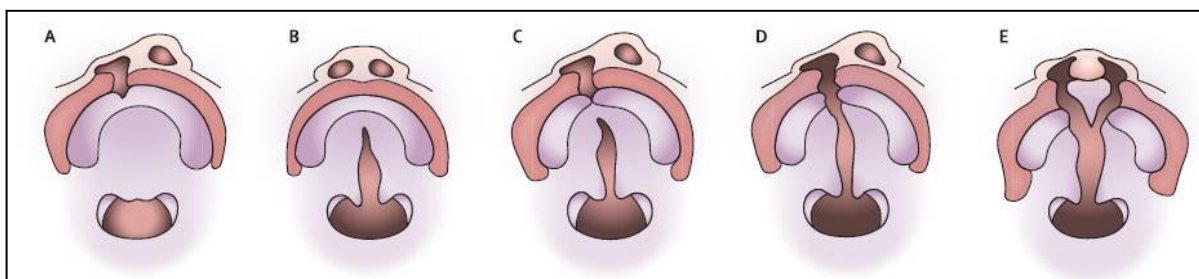
Fissuras do lábio e/ou palato (FL/P) representam as anomalias congênitas mais comuns da face, correspondendo a aproximadamente 65% de todas as malformações da região craniofacial (DIXON *et al.*, 2011). A incidência das FL/P é de aproximadamente 1 em cada 500 – 2.000 nativos, variando de acordo com a localização geográfica, a raça e a condição socioeconômica da população estudada (GUNDLACH e MAUS, 2006). No Brasil, a incidência de FL/P varia de 0,19 a 1,54 para cada 1.000 nascimentos (MARTELLI-JUNIOR *et al.*, 2007; PARANAÍBA *et al.*, 2010).

As FL/P ocorrem em aproximadamente 70% dos indivíduos na forma não-sindrômica (FL/PNS), ou seja, sem associação com outras malformações e sem alterações comportamentais e/ou cognitivas. Os demais 30% estão associados a desordens mendelianas (autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao X), cromossômicas, teratogênicas ou condições esporádicas que incluem múltiplos defeitos congênitos (LIDRAL *et al.*, 2008).

As FL/P são resultantes de defeitos primários na fusão dos processos craniofaciais que formam o palato primário e o secundário, no primeiro trimestre do desenvolvimento intrauterino (SPINA, 1973). Podem apresentar um grande impacto na saúde, qualidade de vida e bem-estar socioeconômico dos indivíduos afetados e de seus familiares. Adicionalmente, problemas de ordenação e hierarquização do sistema público de saúde, bem como de equidade de acesso aos serviços disponíveis, tornam a assistência fora do alcance de muitos pacientes e familiares (MARTELLI-JUNIOR *et al.*, 2008).

Clinicamente as FL/P são classificadas, baseando-se na região de envolvimento anatômico, em 4 grupos: fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais (FL), fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP), que envolvem o palato mole ou duro, fissuras trans-forame incisivo ou fissuras lábio-palatinas (FLP), que envolvem lábio e palato mole/duro e fissuras raras da face (SPINA, 1973) (Figura 8).

Figura 7. Classificação das fissuras. Fissura de lábio e/ou palato. (A) Fissura labial (B) Fissura palatina (C) Fissura lábio-palatina unilateral incompleta (D) Fissura lábio-palatina unilateral completa (E) Fissura lábio-palatina bilateral completa



Fonte: Adaptado de MOSSEY *et al.* (2009).

A incidência de FLP/NS na população varia de acordo com a origem étnica e quanto ao gênero. Verifica-se que indígenas americanos e asiáticos apresentam a maior incidência (1/500 nascimentos), seguida pelos caucasianos (1/1000), enquanto que africanos apresentam a menor incidência (1/2500 nascimentos) (GUNDLACH e MAUS, 2006). As FLP/NS de um modo geral, são mais frequentes no gênero masculino comparado ao feminino. Observa-se ainda, que quanto mais grave o defeito, maior a predileção por homens. Quando as FLP/NS são analisadas separadamente, também existem diferenças entre os gêneros: FL com ou sem ocorrência de FP, é mais frequente entre homens, enquanto a ocorrência isolada de FP é mais frequente em mulheres (MARTELLI-JUNIOR *et al.*, 2008, DIXON *et al.*, 2011; MARTELLI *et al.*, 2012).

Estudos de sua etiologia têm sido amplamente realizados na tentativa de compreender os fatores de riscos e projetar estratégias de prevenção (DIXON *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2017). Mesmo representando um defeito congênito comum, a etiopatogenia das FLP/NS ainda permanece incerta, e, grande parte deve-se ao reflexo da complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos durante a embriogênese craniofacial, com a participação de múltiplos genes e influência de fatores ambientais (DIXON *et al.*, 2011).

Dentre os principais fatores ambientais relacionados à etiologia das FL/PNS estão a idade materna avançada (MARTELLI *et al.*, 2010), a consanguinidade (LEITE e KOIFMAN, 2009), o consumo de bebidas alcoólicas, o tabagismo durante a gestação (LEITE e KOIFMAN, 2009) e a avitaminose, particularmente durante o primeiro trimestre de gestação (JOHNSON e LITTLE, 2008).

Quanto aos fatores genéticos, diversos genes têm sido implicados na relação com as FL/P, entre os genes candidatos à associação com as FL/P, observa-se genes da família *HOX*, *homeobox D1 (HOXD1)* e *muscle segment homeobox 1 (MSX1)* (BEATY *et al.*, 2006; MENEZES *et al.*, 2010).

O *HOXD1* codifica um fator de transcrição que se faz importante no desenvolvimento craniofacial e alterações são associadas à ocorrência de FL/PNS (BEATY *et al.*, 2006). Estudo *in vivo* demonstrou que o desenvolvimento ósseo ocorre pela regulação de genes da família *HOX* expressos pelas células da crista neural, e que a ação sinérgica dos genes *HOX* é fundamental para o desenvolvimento craniofacial (COULY *et al.*, 2002). *MSX1*, um membro da família de genes *homeobox*, codifica um fator de transcrição que é altamente expresso durante a embriogênese e o desenvolvimento ósseo (NASSIF *et al.*, 2014).

Os genes *HOX* podem ser considerados os genes mais importantes na embriologia do crânio e da face, pois controlam vários eventos como a indução, a morte programada de células e a interação do mesênquima com o epitélio durante o desenvolvimento craniofacial. As proteínas codificadas pelos genes *HOX* reprimem ou ativam a expressão de outros genes que regulam processos embriológicos. Em nível celular, esse controle é expresso por meio de dois principais grupos de proteínas reguladoras: a família dos fatores de crescimento e a família do esteróide/tireóide/ácido retinóico. Essas moléculas reguladoras incluem o fator de crescimento fibroblástico (*FGF*), o fator de crescimento epidérmico (*EGF*), o fator alfa de transformação de crescimento (*TGF $\alpha$* ), o fator beta de transformação de crescimento (*TGF $\beta$* ) e as proteínas osteomorfogênicas (*BMPs*) que constituem a mensagem bioquímica dos genes *HOX* para a coordenação da migração celular e posterior interação que regula o crescimento (MOOSEY, 1999). Acredita-se que esses mecanismos carregarão a chave para a compreensão das doenças e das anomalias e estão sendo alvo de intensas pesquisas sobre biologia craniofacial (GARIB *et al.*, 2010).

O *HOXD1* localizado no cromossomo 2 região q31.1, possui 3 éxons e codifica uma proteína com 161 aminoácidos com a função de fator de transcrição envolvido na diferenciação e no desenvolvimento tecidual (COULY *et al.*, 2002). Interessantemente, sua repressão é necessária para o desenvolvimento do osso nasal, da maxila e da mandíbula, enquanto que sua expressão é necessária para a formação do osso hióide (COULY *et al.*, 2002). Além disto, a expressão dos genes *HOX* dos *clusters* A, B e C foi detectado em células hematopoiéticas

normais, enquanto a expressão de todos os *clusters* (A, B, C, D) foi observada em células leucêmicas, demonstrando que genes *HOX* são fatores de transcrição evolutivamente conservados com papéis essenciais tanto na hematopoiese quanto na leucemogênese. (ARGIROPOULOS e HUMPHRIES, 2007; ADAMAKI *et al.*, 2015).

Vários estudos têm relacionado o *HOXD1* com alguns tipos de cânceres, como o do ovário (GOODE *et al.*, 2010), colorretal (PUSSILA *et al.*, 2013) e mama (JESCHKE *et al.*, 2012). A literatura tem sido categórica em reportar um maior risco na incidência de alguns tipos de cânceres nos indivíduos afetados por FL/PNS, possivelmente devido a variações comuns nos genes que regulam o crescimento e o desenvolvimento tecidual (ZHU *et al.*, 2002; BILLE *et al.*, 2005; FREBOURG *et al.*, 2006; MENEZES *et al.*, 2009; TAIOLI *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2011; KUCHLER *et al.*, 2014).

As neoplasias malignas e as FL/PNS têm em comum a influência de fatores de riscos ambientais e genéticos que modulam o desenvolvimento celular. Em face das possíveis relações etiológicas entre essas duas importantes condições de saúde pública, câncer e FL/PNS, vêm surgindo em diversas regiões mundiais, análises sobre esta possível correlação (Texas, USA, Steinwachs *et al.*, 2000; Denmark, Zhu *et al.*, 2002; Bille *et al.*, 2005; Pittsburgh, USA, Menezes *et al.*, 2009; India, Jindal and Vieira, 2012; Latvia, Vieira *et al.*, 2012; Brazil, Lima *et al.*, 2013; Brazil, Martelli *et al.*, 2014; Poland, Hozyasz *et al.*, 2014; Brazil, Gonçalves *et al.*, 2014; Brazil, Machado *et al.*, 2017).

Bille *et al.* (2005) investigaram, a partir de um estudo de coorte desenvolvido em uma população dinamarquesa, a relação entre as neoplasias malignas e as FL/PNS. Como resultados, relataram aumento significativo do risco de cânceres de mama, de cérebro e pulmão, em indivíduos que nasceram com fissuras orais.

Em estudo americano, Menezes *et al.* (2009) identificaram que o gene *axin-related protein* (*AXIN2*), o qual é associado com FL/PNS, quando mutado, aumenta a susceptibilidade para neoplasia maligna de cólon. Esses resultados sugerem que famílias segregando FL/PNS podem apresentar uma probabilidade maior de desenvolver neoplasias malignas e que mutações nesses genes candidatos poderiam levar a aumento da susceptibilidade para o câncer.

Vieira *et al.* (2012) avaliaram o risco de familiares de indivíduos com FL/PNS desenvolverem câncer. Mostraram que esta associação é três vezes maior do que na população em geral e atribuíram esses achados a possíveis mecanismos genéticos comuns entre ambas as condições.

Um estudo transversal foi conduzido por Martelli *et al.* (2014) em uma população brasileira a fim de investigar o risco de FL/PNS em familiares de pacientes com câncer de mama. Apesar de estudos prévios (BILLE *et al.*, 2005; MENEZES *et al.*, 2009) reportarem que famílias com indivíduos nascidos com FL/PNS relatam histórico de câncer de mama com mais frequência do que famílias sem bebês nascidos com defeitos congênitos, seus resultados não demonstraram tais associações.

Em uma revisão sistemática da literatura, Popoff *et al.* (2013) concluíram que um risco aumentado de câncer entre parentes de indivíduos com FL/PNS não pode ser totalmente confirmada. No entanto, estudos com esse propósito específico sugerem que parentes em primeiro e em segundo grau de indivíduos com FL/PNS têm alguns tipos de cânceres com mais frequência do que as famílias sem história de FL/PNS. Destaca a necessidade de novos estudos que permitam associar FL/PNS e câncer.

A associação entre leucemia e FL/PNS permanece incerta e há poucos estudos avaliando esta associação. Zhu *et al.*, (2002) relataram que pais de crianças com FL/PNS apresentam um risco maior de desenvolvimento de neoplasias malignas, particularmente linfomas e leucemias.

Posteriormente, Jindal e Vieira (2012) estudaram a frequência de indivíduos com FL/PNS em famílias de pacientes com LLA. Observaram relações significativas nesse estudo, quando comparado à população em geral.

Gonçalves *et al.* (2014) em um estudo caso-controle avaliou a frequência de leucemia em pais de de 358 pacientes com FL/PNS e 1.432 indivíduos sem alterações craniofaciais ou síndromes. Dos 358 pacientes com FL/PNS, 3 pais tiveram história positiva de leucemia, enquanto 2 de 1.432 indivíduos do grupo controle. A frequência de história familiar positiva de leucemia não foi significativamente aumentado em parentes de primeiro grau de pacientes com FL/PNS.

Assim, percebe-se a necessidade de mais estudos e uma melhor compreensão nas possíveis relações existentes entre cânceres e FL/PNS. Evidências de um risco aumentado para FL/PNS em famílias afetadas por um câncer reforçariam a hipótese que fatores genéticos comuns possam ser responsáveis para essas duas condições. Havendo confirmação desses resultados prévios, um novo campo de pesquisa se abre para compreender melhor a relação entre neoplasias malignas e defeitos congênitos, particularmente as FL/PNS.

Incluir as fissuras orofaciais neste campo de trabalho fundamenta-se pela plausibilidade biológica, além de ampliar a área de concentração relacionada às deformidades craniofaciais consolidada no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros. Além disso, contribui para a pesquisa de fatores de riscos associados à LLA, uma vez que se trata de uma condição multifatorial, cuja patogênese ainda não está completamente esclarecida.

## 4 METODOLOGIA

Os dois estudos que serão apresentados como produtos deste trabalho são: “*Association between hand digit ratio (2D:4D) and acute lymphoblastic leukemia*” e “*Risk of oral clefts in relatives of patients with acute lymphoblastic leukemia*”. A seguir serão descritas características metodológicas referentes aos dois estudos.

### 4.1 Delineamentos dos estudos

Trata-se de estudos observacionais do tipo caso-controle.

### 4.2 Populações dos estudos

A amostra coletada foi de conveniência, e representou os pacientes assistidos no período de fevereiro de 2016 a setembro de 2017 com diagnóstico de LLA, no centro de referência em oncologia da Santa Casa de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

A LLA é uma enfermidade, com taxas de incidência tanto em países desenvolvidos, quanto no Brasil consideradas baixas (4,1 por 100.000/ano em meninos, e 3,6 por 100.000/ano em meninas) (INCA, 2016).

Montes Claros é uma cidade de porte médio, localizada no norte de Minas Gerais, na bacia do rio São Francisco, a 422 km da capital mineira. De acordo com último censo demográfico realizado em 2010, o município possui população residente de 361.971 habitantes. É considerada a principal referência em tratamentos médicos de alta complexidade na região do Norte de Minas (IBGE, 2010).

Diante do exposto considera-se a impossibilidade de captar uma amostra maior, não obstante, o número de casos de LLA avaliados na pesquisa representou uma parcela significativa da



população estudada. Estudo prévio sobre relação entre LLA e histórico de fissuras realizado em um centro de oncologia na Índia teve uma amostra de 85 pacientes acometidos com LLA (Jindal e Vieira , 2012).

A descrição da população estudada em cada artigo encontra-se a seguir:

#### 4.2.1 Artigo 1 “*Association between hand digit ratio (2D:4D) and acute lymphoblastic leukemia.*”

Participaram deste estudo 43 indivíduos de ambos os sexos diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda (grupo LLA) assistidos pelo centro de referência em oncologia da Santa Casa de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil, durante o período de fevereiro de 2016 a setembro de 2017; e 86 indivíduos do grupo controle selecionados entre usuários das clínicas gerais da Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

Os critérios de inclusão dos participantes do grupo LLA consistiram em ter sido ou ser acometido pela leucemia linfoblástica aguda (com laudo confirmando diagnóstico), estar sendo assistido na instituição e possuir idade entre 2 e 17 anos. A restrição da idade baseou-se no fato de que o dimorfismo sexual, característico da proporção 2D:4D, pode ser observado aos dois anos de idade e mantém-se inalterado independente da faixa etária, mesmo que comprimento digital sofra alteração durante o período de crescimento humano (MCINTYRE *et al.*, 2006; GILLAM *et al.*, 2008) , além disso a maior incidência da LLA ocorre na infância, sendo pertinente avaliar a faixa etária de maior prevalência (HUNGER e MULLIGHAN, 2015). O grupo controle compreendeu indivíduos sem histórico pessoal de LLA ou qualquer outra neoplasia maligna pareados por idade e sexo com os indivíduos do grupo LLA e apresentavam características étnicas e socioculturais semelhantes ao grupo LLA.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos envolveram possuir alterações hormonais e apresentarem síndromes resultantes de anormalidades cromossômicas como síndrome de Down (dados obtidos através de relato dos responsáveis pelo paciente e confirmação em prontuários clínicos), histórico de fraturas nos dedos indicadores e anelares das mãos direita e esquerda .

#### 4.2.2 Artigo 2 “*Risk of oral clefts in relatives of patients with acute lymphoblastic leukemia*”.

Participaram deste estudo 50 indivíduos de ambos os sexos diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda (grupo LLA) assistidos pelo centro de referência em oncologia da Santa Casa de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil; e 125 indivíduos do grupo controle sem histórico pessoal de LLA ou qualquer outra neoplasia, selecionados aleatoriamente entre usuários de serviços públicos de saúde de atenção primária e nas clínicas gerais da Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

Pacientes do grupo LLA deviam possuir o seguinte critério de inclusão: ter sido ou ser acometido pela leucemia linfoblástica aguda (com laudo confirmando diagnóstico); o grupo controle compreendeu indivíduos sem histórico pessoal de LLA ou qualquer outra neoplasia maligna pareados por idade e sexo com o grupo LLA.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos envolveram possuir síndromes resultantes de anormalidades cromossômicas como síndrome de Down (dados obtidos através de relato dos responsáveis pelo paciente e confirmação em prontuários clínicos).

#### 4.3 Coleta de dados

A coleta de dados, no estudo 1, envolveu consulta ao prontuário, aplicação de questionário e a medição do comprimento em centímetros dos dedos indicadores e anelares das mãos direita e esquerda, por meio de um paquímetro digital, realizada em dois momentos, conforme Instrumento de Coleta de Dados (Apêndice A). A coleta aconteceu nas dependências do ambulatório de oncologia da Santa Casa de Montes Claros e nas clínicas gerais da Universidade Estadual de Montes Claros/MG.

Foi utilizada a técnica de medição direta por meio da utilização de um paquímetro digital ZAAS Amatoools®, cuja resolução é de 0,01 mm (Figura 8). Este método de análise da proporção 2D:4D apresenta facilidade de uso, reprodutibilidade significativa e baixo custo (JUNG *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2016). O paquímetro é um instrumento usado para

medir com precisão as dimensões de pequenos objetos. Trata-se de uma régua graduada, com encosto fixo, sobre a qual desliza um cursor. O paquímetro possui dois bicos de medição, sendo um ligado à escala e o outro ao cursor.

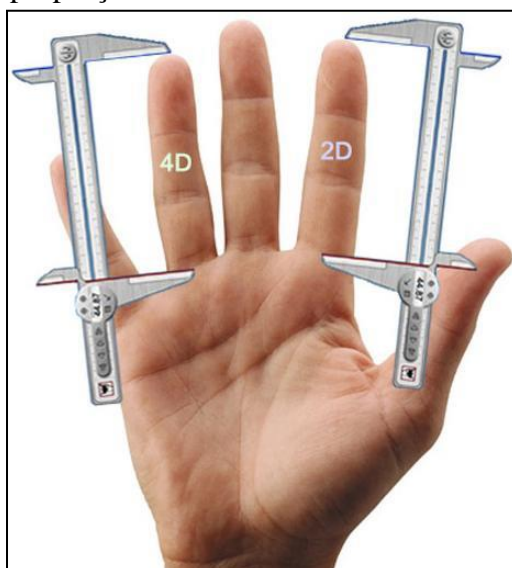
Figura 8. Paquímetro digital



Fonte: <http://www.amatools.com.br>

As medições foram feitas na face palmar das mãos direita e esquerda, com os dedos esticados. Foi realizada inicialmente no dedo indicador e, posteriormente, no dedo anelar. Conforme mostra a figura 9, um bico do paquímetro foi fixado sobre o ponto médio da depressão palmar mais próxima à palma da mão e o outro bico ligado ao cursor deslizou até a ponta dos dedos, tocando-a suavemente. Este ponto foi tomado como referência para finalizar a medição. Posteriormente, foi calculada a razão 2D:4D, ou seja, dividindo-se o comprimento do dedo indicador (2D) pelo comprimento do dedo anelar (4D). Após as duas medições realizadas para cada indivíduo, foram utilizadas as médias dos dois valores obtidos para cálculo estatístico. Um único examinador realizou as medições e a calibração intra-examinador foi realizada previamente.

Figura 9. Paquímetro posicionado nos pontos de referência para medir a proporção 2D:4D



Fonte: <http://www.fingerlengthdigitratio.wordpress.com>

Em estudos envolvendo 2D:4D, recomenda-se verificar a concordância intra e inter-examinador a partir do Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC) (VORACEK *et al.*, 2007). Nesta análise, foram verificados ICC para R2D, R4D, L2D, L4D, R2D4D, L2D:4D e DR-L.

Para o estudo 2, referente ao histórico de fissuras orais, a coleta de dados envolveu consulta ao prontuário médico e aplicação de questionários (Apêndice A), para a obtenção de informações relativas a história familiar de fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas (FL/PNS) em parentes em primeiro grau (pai, mãe, irmão, filho) de pacientes com LLA. Foram apresentadas aos entrevistados uma figura padrão (Apêndice B) sobre a presença ou não de FL/PNS em familiares em primeiro grau e a respectiva classificação clínica da fissura quando presente (SPINA, 1973).

Em ambos estudos foram registradas informações relativas à idade gestacional (semana), peso ao nascer (g), ordem de nascimento, idade materna ao nascimento do paciente (ano), escolaridade materna, história familiar de LLA em parentes em primeiro grau e consanguinidade familiar. Além disso, para os indivíduos do grupo LLA foi identificado a idade do indivíduo no momento do diagnóstico da neoplasia.

#### 4.4 Análise estatística

Nos dois estudos, inicialmente, foram conduzidas análises univariadas dos dados, a fim de descrever as frequências das características gerais das amostras. O teste qui-quadrado e teste exato de Fischer foram empregados para averiguarem a associação entre as características gerais dos grupos.

No estudo 1, foi verificada a normalidade das distribuições das variáveis R2D4D, L2D4D e DRL adotando-se o teste Shapiro-Wilk. Para comparar as proporções 2D:4D, foi utilizado o teste *t* de *student* para variáveis que apresentaram distribuição normal e teste Mann-Whitney para aquelas que não apresentaram normalidade na distribuição. Com o intuito de explorar a significância dos resultados obtidos, além do cálculo do valor *p*, analisou-se o tamanho de efeito das associações, conforme preconizado por Manning (2002), ao ressaltar que esse dado acrescenta informação quanto à força da relação entre as variáveis. O tamanho de efeito consiste em uma medida de magnitude padronizada que representa a importância da associação em termos práticos. Uma medida de tamanho de efeito utilizada é o coeficiente *r* de correlação de Pearson, que se limita ao intervalo entre 0 (sem efeito) e 1 (efeito perfeito) (FIELD, 2009).

No estudo 2, para avaliar a associação entre a LLA e histórico de FL/PNS foi empregado o teste qui-quadrado e o teste exato de Fischer. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) versão 23.0 para Windows®, adotando-se uma significância de 5%.

#### 4.5 Aspectos éticos

Os estudos foram desenvolvidos de acordo com os preceitos determinados pela Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. O projeto “*Leucemia linfoblástica aguda: análise da proporção 2D:4D e prevalência de fissuras labiopalatinas não sindrômicas em parentes*” foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Montes Claros, sendo favorável à sua execução, parecer

consubstanciado nº 1.416.786 /2016 (Anexo A). Todos os indivíduos participantes dos estudos foram devidamente informados a respeito dos mesmos e consentiram sua participação por meio da assinatura do Termos de Consentimento Livre e Esclarecido para Participação em Pesquisa (Apêndice C) e o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para Participação em Pesquisa (Apêndice D).

## 5 PRODUTOS

5.1 Artigo 1: *Association between hand digit ratio (2D:4D) and acute lymphoblastic leukemia.*

Periódico submetido à publicação: *Early Human Development.*

5.2 Artigo 2: *Risk of oral clefts in relatives of patients with acute lymphoblastic leukemia.*

Periódico a ser submetido à publicação : *International Journal of Paediatric Dentistry.*

## 5.1 Artigo 1

**Association between hand digit ratio (2D:4D) and acute lymphoblastic leukemia**

Verônica Oliveira Dias<sup>a,b</sup>, Maria Luiza Santos<sup>b</sup>, Patrícia Helena Costa Mendes<sup>a</sup>, Claudia Diniz Fonseca<sup>a,c</sup>, Daniella Reis Barbosa Martelli<sup>a,b</sup>, Hercílio Martelli Júnior<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Health Science Program. State University of Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais State, Brazil.

<sup>b</sup>Dental School. State University of Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais State, Brazil.

<sup>c</sup>Medicine School. State University of Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais State, Brazil.

**Corresponding author:** Verônica Oliveira Dias – Rua Porto Seguro, 1100, Ibituruna.

Zipcode: 39401-290 Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. Tel: +55-3899862943,

E-mail: veronicaunimontes@yahoo.com.br



## ABSTRACT

*Background:* Digit ratio (2D:4D) has been proposed as a marker for prenatal hormone exposure as well as Homeobox (*HOX*) and androgen receptor (*AR*) genes expression and has been linked to several types of cancer. The *HOX* gene act concomitantly in the differentiation of the fingers as in acute leukemic in childhood. Furthermore, hormonal exposure in early life has been associated with risk of childhood leukemia.

*Aims:* This study investigated the possible correlation between 2D:4D ratios and acute lymphoblastic leukemia.

*Methods:* A case-control study was performed with Brazilian subjects. Direct measurements of the lengths of index and ring fingers of both hands of patients with acute lymphoblastic leukemia (n=43) and controls matched by age and gender (n=86) were obtained using a digital vernier caliper. Mean ratios between the second and fourth digits were compared. Data were analyzed by student's *t*-test and Mann–Whitney test with a significance level of 5%.

*Results:* No significant difference was found between the mean digit ratios of the right and left hands between the groups for any analysis ( $p>0.05$ ), neither for the whole sample nor for the distribution by gender.

*Conclusions:* We observed that patients with acute lymphoblastic leukemia do not have a different digit pattern when compared with unaffected individuals, which may suggest that exposure to prenatal sex hormone is similar between groups.

*Keywords:* Digit ratio; Acute lymphoblastic leukemia; *HOX* gene.

## 1. Introduction

The ratio of the length of the second (index) finger to the fourth (ring) finger (also known as digit ratio or the 2D:4D ratio) has been proposed as marker for prenatal hormone exposure as well as Homeobox (*HOX*) and androgen receptor (*AR*) genes expression [1,2,3]. Digit ratio is a sexually dimorphic trait, being constant since birth and not influenced by the adult hormone levels [4]. High 2D:4D ratio means higher estrogen exposure and a low 2D:4D ratio suggests higher testosterone exposure [5].

Evidence also set out that 2D:4D may be predictive of susceptibility to some types of cancers and that this may be particularly true for cancers that show sex differences in their occurrence, progression, and/or prognosis [6,7]. Approximately 19 genes have been correlated to the formation and differentiation of digit ratios and some of them, specially *HOX* and *AR* genes have been correlated to carcinogenesis [7,8,9].

A molecular level study has observed that prenatal testosterone is related to *HOXA* and *HOXD* genes expression [10]. *HOX* gene regulates essential aspects of embryogenesis, morphogenesis and cell differentiation of different areas of the human body and has been shown to be deregulated in acute leukemic in childhood [11]. Therefore, if 2D:4D is a marker for this gene expression, it could also be linked to leukemic subtypes in childhood since it has been proposed that the dysregulation of *HOX* pathways are a dominant mechanism of leukemic transformation [12]. Furthermore, hormonal exposure in early life has been associated with risk of testicular cancer, breast cancer and childhood leukemia [13,14].

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common neoplasm in children under 5 years old, accounting for about 80% of leukemias in this age group and more frequently in boys than in girls (male:female, 55% to 45%) [15]. On Brazil, the incidence of ALL is about 40 cases per million persons younger than 15 years of age, with the peak incidence occurring at 2 to 5 years of age [16]. Several genetic factors are associated with an increased risk of

ALL, but most patients have no recognized inherited factors. Increased rates of the disease have been linked to exposure to radiation and certain chemicals, but these associations explain only a minority of cases [17].

The possibility of a correlation between 2D:4D and ALL is given to the simultaneous action of *HOX* gene in differentiation of the digit ratios as well as in acute leukemias in childhood. Moreover, both conditions have been associated with prenatal hormonal exposure. Therefore, we hypothesize that 2D:4D may be a potential marker for ALL. Our objective is to investigate whether individuals with ALL have a different digit standard ratio when compared with a similar unaffected population. To our knowledge, there are no studies reporting the potential relationship between 2D:4D and ALL.

## **2. Methods**

### *2.1. Samples*

All patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL group) in the period from february 2016 to september 2017, from the reference hospital in oncology, Montes Claros, Minas Gerais State, Brazil, were evaluated. The following inclusion criteria were applied: 1) having a diagnosis of ALL, 2) undergoing treatment at the institution and 3) age between 2 and 17 years.

After identifying the cases (n=43), control group (n=86) were selected from patients who were assisted by primary-care physicians in health public services and in the University General Hospital. The controls were children free from cancer, age and sex-matched to the case group. Exclusion criteria of both groups included history of fractures on the fingers of hand, hormonal disorders and presenting clinical syndromes resulting from chromosomal abnormalities, such as Down syndrome (data reported by parents or guardians and medical records).

All subjects enrolled in this study reside in the same geographical area (Northern of Minas Gerais State, Brazil). Thus, controls group presented similar demographic, ethnic and sociocultural characteristics to the ALL group. Written informed consents were obtained, and the study was carried out with approval of the University Human Research Ethics Committee (1.416.786/2016).

## 2.2. 2D:4D measurements

The lengths of the second (index) and fourth (ring) fingers were measured using digital vernier calipers with a resolution of 0.01 mm. Two measurements were taken, both by the same researcher; the second measurement was blind to the first and was performed 30 minutes after the first one. Intraobserver reliability was high for digit measurements, with Intraclass Correlation Coefficients (ICC) for 2D= 0.990, 4D= 0.998 and 2D:4D ratio= 0.993. Measurements were taken from the tip of the finger to the basal crease. When two creases were visible at the base of the digit, the crease proximal to the palm was chosen. The analyzed ratio was the mean of the two measurements performed. Measurements were taken on both hands and the right minus left 2D:4D was calculated as the difference between the right and left hand measurements 2D:4D (DR-L). These were identified as right hand digit ratio (R2D4D) and left hand digit ratio (L2D4D); the difference between the right and left 2D:4D is known as DR-L [18].

## 2.3. Statistical analysis

A descriptive and comparative statistical analysis was initially carried out with baseline characteristics from both groups, such as gestational age (week), birth weight (g), birth order, mother age at child's birth (year), mother educational level, family history of ALL (first degree relatives) and family consanguinity. This analysis was performed using a chi-square test and a Fisher's exact test. Cancer is a multi-factorial disease in which both genetic and environmental factors could play significant roles [17] and since the etiology of ALL

remains unknown, it is important to evaluate the baseline characteristics of both groups in the control-case study groups.

The normality was tested to check the distribution of the sample, the Shapiro Wilk test revealed that right hand 2D:4D and left hand 2D:4D followed a normal distribution, but DR–L did not follow a normal distribution. Thus, subsequently, a Student's *t*-test for unpaired samples and a Mann–Whitney test were performed to compare the means of 2D:4D ratios and DR–L among groups. All analyses were conducted using SPSS<sup>®</sup> 23.0 for Windows (IBM SPSS, Armonk, NY USA) with a significance level of 5%.

### 3. Results

The age of the individuals in both groups ranged from 3 to 17 years with a mean age for the ALL group of 9.02 years ( $\pm 4.1$ ) and for the control group of 7.74 years ( $\pm 2.79$ ). The proportion of boys and girls for the ALL group was 55.8% and 44.2%, respectively, and for the control was group 50.0% and 50.0%, respectively ( $p = 0.53$ ).

Baseline characteristics are described in Table 1. Note that features such as gestational age duration (week), birth weight (g), birth order, mother age at child's birth (year), mother educational level, family history of ALL (first degree relatives) did not differ significantly between the two groups, but not to the family consanguinity that there was significant difference between the two groups ( $p = 0.01$ ). The mean of patients' age at the time of diagnosis was 6.14 years ( $\pm 4.33$ ).

Table 2 shows the means and standard deviations for the 2D:4D ratios of the right and left hands, the differences between right hand and left hand 2D:4D (DR–L) between the ALL and control groups for the whole sample as well as for the distribution by gender. No statistically significant difference was observed ( $p > 0.05$ ). Note that the means and confidence intervals of the 2D:4D ratios of the right and left hands for the ALL and control groups were very close, as shown in Figure 1.

#### 4. Discussion

During the development of 2D:4D, at least 19 skeletogenic genes are activated or deactivated by prenatal testosterone and estrogen, as well as homeobox and androgen receptor gene [6]. Among these genes, the abnormal expression of homeobox gene *HOXA* is implicated in the development of acute leukemic in childhood [12,19]. This overexpression of *HOXA* seems to associate with both pediatric acute myeloid leukemia and ALL. This gene is a critical regulator of normal blood cell development and it is normally expressed very early in hematopoietic progenitors [11].

These observations strongly indicate that dysregulation of *HOX* pathways are a dominant mechanism of leukemic transformation [11,12]. Our working hypothesis was that the concomitant influence of *HOX* gene in the differentiation of fingers, determined by intrauterine exposure to sex hormones as well as in the development of acute leukemic in childhood could result in a specific pattern of 2D:4D ratio in individuals affected by ALL. However, the results obtained in this study did not support this hypothesis since the differences between the 2D:4D ratios of both groups were not significant for any of the analyses performed.

When comparing the means of 2D:4D ratios of all participants between the two groups, we observed very similar averages. This suggests that prenatal estrogen levels in patients with ALL do not differ from clinically normal individuals and exposure to prenatal hormones does not appear to be associated with the occurrence of ALL.

Another result that confirms the absence of a specific digital standard for individuals with ALL was the presence of sexual dimorphism observed between the boys and girls in both groups. The mean for 2D:4D ratios of girls with ALL were greater than those of boys with the same condition. This result is supported by the literature, which states that in general men tend to have a shorter second digit than the fourth, and in women the second tends to be

the same size or slightly longer than the fourth digit, leading to 2D:4D ratios sexually dimorphic with mean male 2D:4D ratios lower than mean female ratios [2].

Previous studies have provided mixed findings regarding an association of the 2D:4D ratio with cancer [13,20,21,22]. For instance, a study from Brazil with 100 patients diagnosed with prostate cancer showed a lower 2D:4D ratio for affected than for healthy subjects [21]. Similarly, a study done in a group with 85 primary brain tumor patients reported 2D:4D ratios lower relatively to healthy individuals suggesting greater prenatal testosterone and lower prenatal estrogen exposure in brain tumor patients [20]. On the other hand, higher 2D:4D ratios were reported in patients with breast cancer and gastric cancer relative to age- and sex-matched controls [13,22]. Other research did not find an association between 2D:4D ratio and testicular cancer [23]. These mixed findings regarding an association of the 2D:4D ratio with cancer suggest that prenatal sex steroid exposures can have different associations with different cancer types [20].

A critical review of the literature on direct versus Indirect measurement of digit ratio recently points out that if small numbers of participants are involved and there is adequate time to measure, then direct measurements are indicated [24]. We chose the direct technique for measuring the length of fingers using vernier calipers because of its significant reproducibility, low cost and practicality.

Both 2D:4D ratio and the prevalence of ALL show differences between races and ethnic groups. Black subjects have a lower digit ratio compared with white subjects and contrastingly white subjects present a higher incidence of ALL than black subjects [2,17]. Within this context, it is important to make some remarks about the Brazilian population's race. The Brazilian population was formed by extensive mixture from three different ancestral roots: Amerindians, Europeans, and Africans. This resulted in a great variability of skin pigmentation, with no discontinuities between black and white skin color [25]. Thus, the race

of Brazilian individuals cannot be determined by skin colour. The ideal method is to genetically identify the contribution of each ancestry to characterize the race of the study population. Several studies conducted in different Brazilian populations, including the population of the state of this present study, concluded that European ancestry is the major contributor to the genetic background of Brazilians [26,27].

Due the ALL shows significantly variability across geographic origin, racial and ethnic characteristics as well as socioeconomic status, we suggest further studies in different populations, from different areas of Brazil with larger samples to fully uncover the relationship between 2D4D and ALL.

## **5. Conclusion**

Based on the results obtained in this study, we observed that patients with ALL do not have a different digit pattern when compared with unaffected individuals, which may suggest that intrauterine exposure to sex hormones is similar between groups and that the 2D:4D ratio may not be a marker for this specific type of cancer.

## **Aknowledgements**

This work was supported by grants from The Minas Gerais State Research Foundation-Fapemig, Brazil; National Council for Scientific and Technological Development-CNPq, Brazil.

## **Conflicts of interest**

The authors declare no conflict of interest.



## References

- [1] J.T. Manning, D. Scutt, J. Wilson, D.I. Lewis-Jones, The ratio of 2nd to 4th digit length: a predictor of sperm numbers and concentrations of testosterone, luteinizing hormone and oestrogen, *Hum. Reprod.* 13 (1998) 3000–3004.
- [2] J.T. Manning, P.E. Bundred, B.F. Flanagan, The ratio of 2nd to 4th digit length: a proxy for transactivation activity of the androgen receptor gene?, *Med Hypotheses*. 59 (2002) 334–336.
- [3] J.T. Manning, M. Callow, P.E. Bundred, Finger and toe ratios in humans and mice: implications for the aetiology of diseases influenced by HOX genes, *Med Hypotheses*. 60 (2003) 340–343.
- [4] J.T. Manning, A.G. Stewart, P. Bundred, R. Trivers, Sex and ethnic differences in 2nd to 4th digit ratio of children, *Early Hum Dev.* 80 (2004) 161–68.
- [5] S. Lutchmaya, S. Baron-Cohen, P. Raggatt, R. Knickmeyer, J.T. Manning, 2nd to 4th digit ratios, fetal testosterone and estradiol, *Early Hum Dev.* 77 (2004) 23–28.
- [6] Z. Zheng, M.J. Cohn, Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios, *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (2011) 16289–16294.
- [7] R.N. Hopp, J. Jorge, Right hand digit ratio (2D:4D) is associated with oral cancer, *Am J Hum Biol.* 23 (2011) 423–425.
- [8] J.T. Manning, S. Leinster, The ratio of 2nd to 4th digit length and age at presentation of breast cancer: a link with prenatal oestrogen, *Breast.* 22 (2001) 61–69.
- [9] C.W. Chua, Y.T. Chiu, H.F. Yuen, K.W. Chan, X. Wang, M.T. Ling, Y.C. Wong, Differential expression of MSX2 in nodular hyperplasia, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate adenocarcinoma, *APMIS.* 118 (2010) 918–926.

- [10] C. Zhang, J. Dang, L. Pei, M. Guo, H. Zhu, L. Qu, F. Jia, H. Lu, Z. Huo, Relationship of 2D: 4D finger ratio with androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphism, *Am J Hum Biol.* 25 (2013) 101-06.
- [11] M. Adamakia, G.I. Lambrou, A. Athanasiadou, S. Vlahopoulou, A.G. Papavassiliou, M. Moschovi, HOXA9 and MEIS1 gene overexpression in the diagnosis of childhood acute leukemias: Significant correlation with relapse and overall survival, *Leuk Res* .39 (2015) 874–882.
- [12] B. Argiropoulos, R.K. Humphries, Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis, *Oncogene.* 26 (2007) 6766–6776.
- [13] L. Hong, M. Zhan-Bing, S. Zhi-Yun, S. Xiao-Xia, Z. Jun-Li, H. Zheng-Hao, Digit ratio (2D:4D) in Chinese women with breast cancer, *Am J Hum Biol.* 26 (2014) 562–564.
- [14] M.S. Pombo-de-Oliveira, S. Koifman, Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 15 (2006) 2336-2341.
- [15] N. Howlader, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011. National Cancer Institute. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2011/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/), 2014 (accessed 06.28.2016).
- [16] Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro, Inca, 2016.
- [17] S.P. Hunger, C.G. Mullighan, Acute Lymphoblastic Leukemia in Children, *N Engl J Med.* 373 (2015) 1541-1552.

- [18] D.C. Muller, L. Baglietto, J.T. Manning, C. McLean, J.L. Hopper, D.R. English, G.G. Giles, G. Severi, Second to fourth digit ratio (2D:4D), breast cancer risk factors, and breast cancer risk: a prospective cohort study, *Br J Cancer*. 107 (2012) 1631–1636.
- [19] J. Soulier, E. Clappier, J.M. Cayuela, A. Regnault, M. Garcia-Peydro, H. Dombret, A. Baruchel, M.L. Toribio, F. Sigaux, HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL), *Blood*. 106 (2005) 274-286.
- [20] R. Bunevicius, S. Tamasauskas, V.P. Deltuva, A. Tamasauskas, A. Sliuzys, Digit ratio (2D:4D) in primary brain tumor patients: a case-control study, *Early Hum Dev*. 103 (2016) 205–208.
- [21] P.H.C. Mendes, D.R.B. Martelli, S.M. Costa, E. Gonçalves, C.P. Macedo, M.F. Silveira, H. Martelli-Júnior, Comparison of digit ratio (2D:4D) between Brazilian men with and without prostate cancer, *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 19 (2016) 107-110.
- [22] E. Gonçalves, G.G. Viana Veloso, L.M. Paranaíba, P.H. Mendes, D.R. Martelli, M.F. Silveira, H. Martelli-Júnior, Hand digit ratio (2d:4d) and gastric cancer risk: a cross-sectional study among southeastern Brazilians, *J Xiangya Med*. 2 (2017) 1-5.
- [23] J. Auger, F. Eustache, Second to fourth digit ratios, male genital development and reproductive health: a clinical study among fertile men and testis cancer patients, *Int. J. Androl*. 34 (2011) 1365–2605.
- [24] E. Ribeiro, N. Neave, R.N. Morais, J.T. Manning, Direct versus indirect measurement of digit ratio (2D:4D): a critical review of the literature and new data, *Evolutionary Psychology*. 14 (2016) 1-8.
- [25] S.D. Pena, G. Di Pietro, M. Fuchshuber-Moraes, The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected, *PLoS One*. 6 (2011) e17063.

- [26] R.R. Moura, A.V.C. Coelho, V.Q. Balbino, S. Crovela, L.A.C Brandão, Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries, *Am J Hum Biol.* 27(2015) 674–80.
- [27] S.N. Aquino, A.C. Messeti, E. Bagordakis, H. Martelli Júnior, M.S.O. Swerts, E. Graner, R.D. Coletta, Polymorphisms in FGF12, VCL, CX43 and VAX1 in Brazilian patients with nonsyndromic cleft lipwith or without cleft palate, *BMC Med Genet.* 14 ( 2013) 53-62.

**Table 1** – Characteristics of patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL Group) and Control Group.

<b>Characteristics</b>	<b>ALL Group</b> n=43 <b>n (%)</b>	<b>Control Group</b> n=86 <b>n (%)</b>	<b>p-value</b>
<b><i>Gestational age (weeks)</i></b>			
< 37	02 (4.7)	10 (11.6)	
37 – 41	38 (88.4)	70 (81.4)	0.435 <sup>a</sup>
≥ 42	03 (7.0)	06 (7.0)	
Mean (sd)	39.42 (2.805)	39.35 (2.170)	
<b><i>Birth weight (g)</i></b>			
< 2500	04 (9.3)	11 (12.8)*	
2500 – 3999	33 (76.7)	70 (81.4)*	0.090 <sup>a</sup>
≥ 4000	06 (14)	03 (3.5)*	
Mean (sd)	3.288 (0.626)	3.134 (0.626)	
<b><i>First-born</i></b>			
Yes	14 (32.6)	36 (41.9)	0.307 <sup>a</sup>
No	29 (67.4)	50 (58.1)	
<b><i>Maternal Age (years)</i></b>			
< 35	37 (86.0)	79 (91.9)	0.301 <sup>a</sup>
≥ 35	6 (14.0)	7 (8.1)	
Mean (sd)	27.07 (6.720)	25.53 (5.895)	
<b><i>Maternal education (years)</i></b>			
< 5	06 (13.9)	2 (2.3)	
5 – 8	11 (25.6)	23 (26.7)	0.38 <sup>a</sup>
≥ 9	26 (60.5)	61 (70.9)	
<b><i>Family history of ALL</i></b>			
Yes	0	0	
No	43	86	

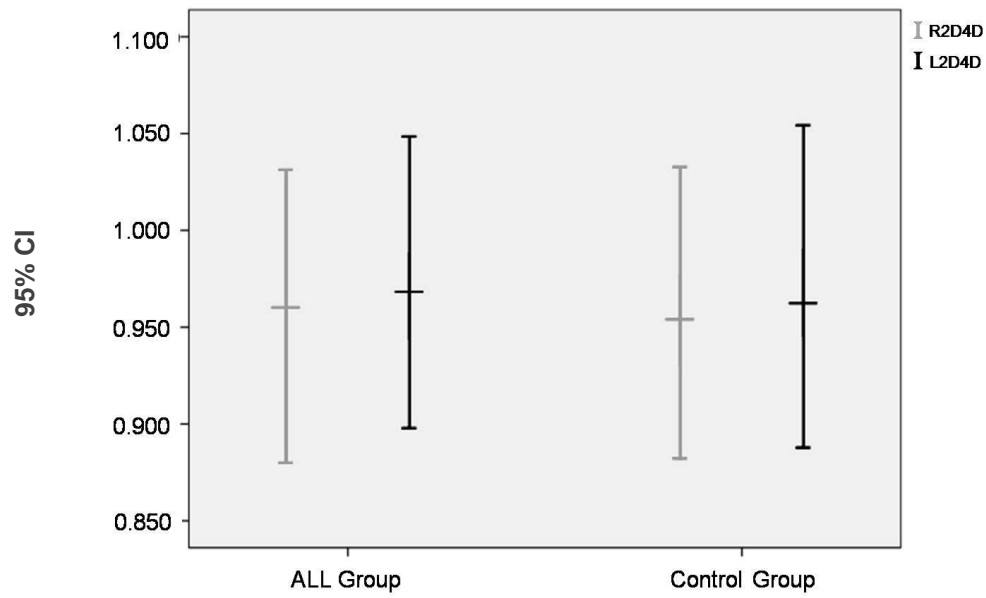
Characteristics	ALL Group n=43 n (%)	Control Group n=86 n (%)	p-value
<i>Family consanguinity</i>			
Yes	04 (9.3)	0	0.011 <sup>b</sup>
No	39 (90.7)	86 (100)	

<sup>a</sup> Chi-square test; <sup>b</sup> Fisher's exact test. \*Missing

**Table 2** - Comparison of right hand digit ratio (R2D4D), left hand digit ratio (L2D4D) and right hand minus left hand digit ratio (DR-L) among patients with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL Group) and Control Group.

All participants, n	ALL Group Mean (sd) 43	CI 95%	Control Group Mean (sd) 86	CI 95%	p-value	r
R2D4D	0.9609(0.0343)	(0.9503-0.9715)	0.9549 (0.0351)	(0.9465-0.9616)	0.292 <sup>a</sup>	0.093
L2D4D	0.9663 (0.0334)	(0.9560-0.9766)	0.9645 (0.0333)	(0.9573-0.9716)	0.767 <sup>a</sup>	0.026
DR-L	-0.0054 (0.0300)	(-0.0146-0.0038)	-0.0104 (0.0259)	(-0.0160-(-0.0049))	0.236 <sup>b</sup>	0.087
<i>Distribution by gender</i>						
<b>Girls, n</b>	<b>19</b>		<b>43</b>			
R2D4D	0.9675 (0.0309)	(0.9526-0.9825)	0.9651 (0.2757)	(0.9565-0.9737)	0.756 <sup>a</sup>	0.038
L2D4D	0.9723 (0.0308)	(0.9565-0.9862)	0.9701 (0.0314)	(0.9603-0.9799)	0.891 <sup>a</sup>	0.017
DR-L	-0.0037 (0.0262)	(-0.0164-0.0088)	-0.0050 (0.0239)	(-0.0125-0.0023)	0.852 <sup>a</sup>	0.024
<b>Boys, n</b>	<b>24</b>		<b>43</b>			
R2D4D	0.9557 (0.0366)	(0.9402-0.9711)	0.9434 (0.0390)	(0.9314-0.95454)	0.211 <sup>a</sup>	0.132
L2D4D	0.9624 (0.0355)	(0.9474-0.9774)	0.9598 (0.0349)	(0.9489-0.9707)	0.776 <sup>a</sup>	0.035
DR-L	-0.0067 (0.0332)	(-0.0207-0.0073)	-0.01408 (0.0257)	(-0.0221-(-0.0060))	0.110 <sup>b</sup>	0.124

<sup>a</sup> Student's t-test for unpaired samples; <sup>b</sup> Mann Whitney Test



**Figure 1.** Confidence intervals of the 2D:4D ratios of the right and left hands of patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL Group) and Control Group.

## 5.2 Artigo 2

**Frequency of oral clefts in relatives of patients with acute lymphoblastic leukemia**

Verônica Oliveira Dias<sup>1</sup>, Daniella Reis Barbosa Martelli<sup>1</sup>, Maria Luiza Santos<sup>1</sup>, Célia Márcia Maia<sup>1</sup>, Ricardo D. Coletta<sup>2</sup>, Hercílio Martelli Júnior<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Health Science Program, State University of Montes Claros, Unimontes, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry, State University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>Center for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, Dental School, University of José Rosário Vellano, Unifenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil.

**Correspondence address:**

Verônica Oliveira Dias

Health Science Program, State University of Montes Claros, Brazil

Avenida Cula Mangabeira 562, Bairro Santo Expedito, Postal Code: 39401-001 Montes

Claros, Minas Gerais, Brazil.

Phone: +55-38-32248372

E-mail: veronicaunimontes@yahoo.com.br



## Short Communication

Oral clefts are the most common orofacial birth defect, occurring in 1 in 500-2,500 live births worldwide<sup>1</sup>. In Brazil, the prevalence varies from 0.36 and 1.54 per 1,000 live births<sup>2,3</sup>. About 70% of cases occur as a nonsyndromic form (nonsyndromic oral cleft – NOC), and the remaining 30% are associated with Mendelian disorders or chromosomal, teratogenic and sporadic conditions<sup>4</sup>. NOC are caused by a complex interplay between environmental exposures and genetic factors<sup>1</sup>. Relatively few studies have investigated the association between genetic variants and environmental factors in NOC<sup>5</sup>.

Approximately 6,000 cases of acute lymphoblastic leukemia (ALL) are diagnosed in the United States annually, with half of the cases occurring in children and teenagers. It is the most common cancer among children and the most frequent cause of death from cancer before 20 years of age<sup>6,7</sup>. In Brazil, the incidence of ALL is about 40 cases per million persons under 15 years with a peak incidence in 2 to 5 years of age<sup>8</sup>.

In the last years, epidemiological studies have assessed the relationship between cancer and NOC in different populations (*Texas, USA*<sup>9</sup>; *Denmark*<sup>10</sup>; *Pittsburgh, USA*<sup>11</sup>; *India*<sup>12</sup>; *Brazil*<sup>13</sup>; *Southeast Asian*<sup>14</sup>; *Brazil*<sup>15</sup>; *Poland*<sup>16</sup>; *Brazil*<sup>17</sup>; *Brazil*<sup>18</sup>) and the results are controversial.

The aim of the current study was to determine the frequency of NOC in families of patients with ALL.

After proper State University of Montes Claros, Minas Gerais, Brazil, Institutional Review Board approval, we conducted a case-control study, containing 50 patients with ALL and 125 controls. ALL patients were recruited in the Oncology Department of Santa Casa, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil and health controls were randomly obtained from the General Clinics at the University. Patients were recruited for the time period of 2016-2017.

The parents or guardians of the patients answered a questionnaire with basic demographic information about their children and their family history of NOC in the first-degree relatives.

The *t*-test and chi-square test, respectively, assessed whether age and gender for the two groups were statistically different from each other. Statistical analysis was also carried out using chi-square and Fisher's exact tests (expected frequency values fell below 5) to determine statistically significant differences between both groups of patients with an alpha of 0.05.

The average age of the cases diagnosed with ALL was 13.20 years (standard deviation  $\pm$  12.20 years) and control group was 11.30 years (standard deviation  $\pm$  10.36 years). The age distribution was not different between groups ( $p = 0.30$ ). The proportion of men and women between ALL group were 56.0% and 44.0%, respectively, and control group 48.8% and 51.2%, respectively ( $p = 0.38$ ).

From 50 patients with ALL, 2 had a positive history of NOC. In the control group, no patient reported family history of NOC (1 df chi-square,  $p=0.02$ ; Fisher's exact test, ( $p=0.08$ ). With this sample size, frequency of NOC as 1/1,000 live births and the average of the Brazilian family size of 25 individuals<sup>8</sup>, we would expect to identify approximately 1 or 2 cases of NOC in relatives of patient with ALL ( $50 \times 25 / 1,000$ ) and 3 or 4 cases among relatives of the controls ( $125 \times 25 / 1,000$ ).

In the present study the frequency of NOC was increased in the first-degree relatives of patients with ALL. Jindal and Vieira<sup>12</sup> (2012) showed a correlation between ALL and NOC in a population from India. The occurrence of NOC was more frequent in families with ALL than in families without the diagnosis of this pediatric cancer. A higher risk for leukemia in relatives of children born with oral clefts was also reported<sup>10</sup>. Martelli et al.<sup>15</sup> (2014) analyzed the risk of NOC in families of women with breast cancer, but they were unable to confirm a general increase in the risk of NOC among families of women with breast cancer. Recently,

we studied the relationship between breast and gastric cancer and NOC. Our results suggest that polymorphic variants in *AXIN2* and *CDH1* may be associated with NOC and reinforce the putative link between cancer and oral clefts<sup>18</sup>. In another study, Menezes et al.<sup>11</sup> (2009) showed a more frequent family history of cancer (colon, brain, leukemia, breast, prostate, skin, lung and liver) in relatives of NOC compared to the control group.

Investigating the relationship between malformations and malignancies is important, as it is speculated that they might have common causes. Studies with larger samples and molecular analyses are needed to better understand the possible relationships in the etiology of cancer and NOC.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from The State of Minas Gerais Research Foundation-FAPEMIG, Minas Gerais, Brazil. The National Council for Scientific and Technological Development-CNPq and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-CAPES, Brasília, Brazil.

## References

1. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 2011; **12**: 167-178.
2. Martelli-Júnior H, Porto LV, Martelli DR, Bonan PRF, Freitas AB, Coletta RD. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. *Braz Oral Res* 2007; **21**: 314-317.
3. Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. Prevalence of oral clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res* 2009; **23**: 38-42.
4. Meng L, Bian Z, Torensma R, Von den Hoff JW. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J Dent Res* 2009; **88**: 22-33.
5. Machado RA, Moreira HS, de Aquino SN et al. Interactions between RAD51 rs1801321 and maternal cigarette smoking as risk factor for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Am J Med Genet A* 2016; **170**: 536-9.
6. Linabery AM, Ross JA. Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004). *Cancer* 2008; **112**: 416-432.
7. Smith MA, Seibel NL, Altekruse SF et al. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 2625-2634.
8. INCA, The National Cancer Institute. Cancer statistic. Brazil: INCA, 2016.
9. Steinwachs E, Amos C, Johnston D, Mulliken J, Hecht J. Nonsyndromic cleft lip and palate is not associated with cancer or other birth defects. *Am J Hum Genet* 2000; **90**: 17-24.
10. Zhu JL, Basso O, Hasle H, Winther JF, Olsen JH, Olsen J. Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? A nationwide study in Denmark. *Br J Cancer* 2002; **87**: 524-528.
11. Menezes R, Marazita ML, McHenry TG, Vieira AR. AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. *J Am Dent Assoc* 2009; **140**: 80-84.

12. Jindal A, Vieira AR. Family history of cleft lip and palate in subjects diagnosed with leukemia. *Am J Med Genet* 2012; **58**: 678-679.
13. Lima LS, Silvério MO, Swerts MSO, Aquino SN, Martelli DR, Martelli Júnior H. Frequency of cancer in first-degree relatives of patients with cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Braz Dent J* 2013; **24**: 200-203.
14. Benusiglio PR, Caron O, Consolino E et al. Cleft lip, cleft palate, hereditary diffuse cancer and germline mutations in CDH1. *Int J Cancer* 2013; **132**: 2470.
15. Martelli DR, Vieira AR, Fonseca AT, Coletta RD, Soares PB, Martelli Júnior H. Risk of nonsyndromic cleft lip and palate in relatives of women with breast cancer. *Am J Med Genet A* 2014; **164**: 270-271.
16. Hozyasz KK, Mostowska A, Woźcicki P et al. Nucleotide variants of the cancer predisposing gene CDH1 and the risk of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Fam Cancer* 2014; **13**: 415-421.
17. Brito LA, Yamamoto GL, Melo S et al. Rare variants in the epithelial cadherin gene underlying the genetic etiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Human Mutation* 2015; **36**: 1029-1033.
18. Machado RA, de Freitas EM, de Aquino SN et al. Clinical relevance of breast and gastric cancer-associated polymorphisms as potential susceptibility markers for oral clefts in the Brazilian population. *BMC Med Genet* 2017; **4**: 18-39.

## 6 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados dos estudos apresentados, pode-se concluir que:

1. Não foram encontradas diferenças significativas em relação às médias das proporções 2D:4D entre indivíduos afetados por leucemia linfoblástica aguda e indivíduos não afetados, o que sugere a ausência de um padrão digital específico em pacientes que apresentam esta condição. Tais resultados sugerem que, apesar de haver influência concomitante de genes atuando tanto na diferenciação dos dedos como na ocorrência de leucemia linfoblástica aguda, os níveis pré-natais de hormônios sexuais não diferem entre os grupos, não sendo a proporção 2D:4D um marcador para a referida doença.

2. Pacientes diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda apresentaram mais frequentemente histórico de fissuras orais em parentes em primeiro grau do que indivíduos clinicamente saudáveis, sugerindo uma associação entre as fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas e a leucemia linfoblástica aguda. Essa relação poderia indicar mecanismos e participação de genes comuns, entre estas duas entidades, como exemplo, os genes da família *HOX*.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Além das conclusões apresentadas, os resultados observados nos referidos estudos permitem considerar que:

- Considerando que este é o primeiro estudo que buscou avaliar a associação entre a proporção 2D:4D à leucemia linfoblástica aguda, sugere-se a realização de pesquisas adicionais envolvendo populações maiores e de diferentes ancestralidades, uma vez que tanto a prevalência desta neoplasia como a proporção 2D:4D variam entre grupos étnicos/raciais.
- A relevância das evidências de que indivíduos diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda relatam mais frequentemente histórico de fissuras labiais e/ou palatinas na família do que indivíduos clinicamente saudáveis, poderá contribuir, em acréscimo, à pesquisa dos fatores de risco tanto para leucemia quanto para fissuras orais e como estratégia adicional em medidas de rastreamento para diagnóstico precoce.

## REFERÊNCIAS

ADAMAKI M., LAMBROU G.I., ATHANASIADOU A., VLAHOPOULOSA S., PAPAVALASSILOU A.G., MOSCHOVI M. HOXA9 and MEIS1 gene overexpression in the diagnosis of childhood acute leukemias: Significant correlation with relapse and overall survival, **Leukemia Research**, v.39, p. 874-82, 2015.

ARGIROPOULOS B., HUMPHRIES R.K. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. **Oncogene**, v.26, n.47, p.6766-76, 2007.

BAIK I., DEVITO W.J., BALLEEN K., BECKER P.S., OKULICZ W., LIU Q., et al. Association of fetal hormone levels with stem cell potential: evidence for early life roots of human cancer. **Cancer Research**, v. 65, n.1, p.358-63, 2005.

BEATY T.H., HETMANSKI J.B., FALLIN M.D., PARK J.W., SULL J.W., MCINTOSH I. et al. Analysis of candidate genes on chromosome 2 in oral cleft case-parent trios from three populations. **Human Genetics**, v.120, n.4, p.501-18, 2006.

BELSON M., KINGSLEY B., HOLMES A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n.1, p. 138-45, 2007.

BENE M.C., CASTOLDI G., KNAPP W., LUDWIG W.D., MATUTES E., ORFAO A. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia**, v.9, n.10, p.1783-86, 1995.

BENE M.C. Immunophenotyping of acute leukemias. **Immunology Letters**, v.98, n.1, p.9-21, 2005.

BILLE C., WINTHER J.F., BAUTZ A., MURRAY J.C., OLSEN J., CHRISTENSEN K. Cancer risk in persons with oral cleft--a population-based study of 8,093 cases. **American Journal of Epidemiology**, v.161, n.11, p. 1047-55, 2005.

BIRNBAUM S., REUTTER H., MENDE M., DE ASSIS N.A., DIAZ-LACAVA A., HERMS S. et al. Further evidence for the involvement of MYH9 in the etiology of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. **European Journal of Oral Sciences**, v.117, n.2, p.200-3, 2009.

BREEDLOVE S.M. Minireview: Organizational hypothesis: instances of the fingerpost. **Endocrinology**, v, 151, n. 9, p.4116-22, 2010.

BUNEVICIUS R., TAMASAUSKAS S., DELTUVA V.P., TAMASAUSKAS A., SLIAUZYS A. Digit ratio (2D:4D) in primary brain tumor patients: a case-control study, **Early Human Development**; v. 103, p.205-8, 2016.



BUSKE C., HUMPHRIES R.K. Homeobox genes in leukemogenesis. **International Journal of Hematology**, v.71, n. 4, p.301-8, 2000.

CHUA C.W., CHIU Y.T., YUEN H.F., CHAN K.W., WANG X., LING M.T. et al. Differential expression of MSX2 in nodular hyperplasia, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate adenocarcinoma. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v.118, n. 12, p. 918-26, 2010.

COULY G., CREUZET S., BENNACEUR S., VINCENT C., LE DOUARIN N.M. Interactions between Hox-negative cephalic neural crest cells and the foregut endoderm in patterning the facial skeleton in the vertebrate head. **Development**, v.129, n. 4, p.1061-73, 2002.

DE SOUZA REIS R.S.R., DE CAMARGO B., DE OLIVEIRA SANTOS M., DE OLIVEIRA J.M., AZEVEDO SILVA F., POMBO-DE-OLIVEIRA M.S. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 56, n.1, p. 58-64, 2011.

DIXON M.J., MARAZITA M.L., BEATY T.H., MURRAY J.C. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. **Nature Reviews. Genetics**, v. 12, n.3, p. 167-78, 2011.

FIELD A. **Descobrimos a estatística utilizando o SPSS**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2009.

FREBOURG T., OLIVEIRA C., HOCHAIN P. Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. **Journal of Medical Genetics**, v.43, n.2, p.138-42, 2006.

GARIB D.G., SILVA FILHO O., JANSON G., PINTO J.H.N. Etiologia das máx oclusões: perspectiva clínica (parte III) – fissuras labiopalatinas. **Revista Clínica de Ortodontia Dental Press**, v. 9, n. 4, p. 30-36, 2010.

GARN S.M., BURDI A.R., BABLER W.J., STINSON S. Early prenatal attainment of adult metacarpal-phalangeal rankings and proportions. **American Journal of Physical Anthropology**, v.43, n.3, p.327-32, 1975.

GILLAM L, MCDONALD R, EBLING FJ, MAYHEW TM. Human 2D (index) and 4D (ring) finger lengths and ratios: cross-sectional data on linear growth patterns, sexual dimorphism and lateral asymmetry from 4 to 60 years of age. **Journal of Anatomy**, v.213, n.3, p.325-35, 2008.

GONCALVES E, MARTELLI DR, COLETTA RD, VIEIRA AR, CALDEIRA AP, MARTELLI Jr H. Risk of leukemia in first degree relatives of patients with nonsyndromic cleft lip and palate. **Brazilian Oral Research**, v. 28, p. 1-3, 2014.

GONÇALVES E, VIANA VELOSO GG, PARANAÍBA LM, MENDES PH, MARTELLI DR, SILVEIRA MF, MARTELLI JÚNIOR H. Hand digit ratio (2d:4d) and gastric cancer risk: a cross-sectional study among southeastern Brazilians. **Journal of Xiangya Medicine**, v. 2, p. 1-5, 2017.

GOODE EL, CHENEVIX-TRENCH G, SONG H, RAMUS SJ, NOTARIDOU M, LAWRENSON K, et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ovarian cancer at 2q31 and 8q24. **Nature Genetics**, v. 42, n. 10, p. 874-79, 2010.

GOODMAN FR, SCAMBLER PJ. Human HOX gene mutations. **Clinical Genetics**, v. 59, n.1, p. 1-15, 2001.

GREAVES M. In utero origins of childhood leukaemia. **Early Human Development**, v. 81, n. 1, p.123-29, 2005.

GREAVES M. Infection, immune responses and the etiology of childhood leukemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n.3, p.193-203, 2006.

GUIMARÃES, LO. Caracterização de subpopulação de leucemia mielóide aguda portadora de rearranjo de *MLL* quanto a resposta diferencial ao tratamento em longo prazo com citarabina [tese]. Ribeirão Preto, Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2015.

GUNDLACH KKH, MAUS C. Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world-wide. **Journal of Cranio-maxillofacial Surgery**, v.34, p.1-2, 2006.

HOFFBRAND AV, MOSS PAH, PETTIT JE. **Fundamentos em Hematologia**, 2008.

HÖNEKOPP J, BARTHOLDT L, BEIER L, LIEBERT A. Second to fourth digit length ratio (2D:4D) and adult sex hormone levels: new data and a meta-analytic review. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n.4, p.313-21, 2007..

HÖNEKOPP J, WATSON S. Meta-analysis of digit ratio 2D:4D shows greater sex difference in the right hand. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n.5, p.619-30, 2010.

HONG L, ZHAN-BING M, ZHI-YUN S, XIAO-XIA S, JUN-LI Z, ZHENG-HAO H. Digit ratio (2D:4D) in Chinese women with breast cancer. **American Journal of Human Biology**, v. 26, n.4, p. 562-64, 2014.

HOPP R.N., JORGE J. Right hand digit ratio (2D:4D) is associated with oral cancer. **American Journal of Human Biology**, v.23, n.3, p.423-25, 2011.

HOPP R.N., JORGE J. Right hand digit ratio (2D:4D) is associated with prostate cancer: Findings of an admixed population study. **Journal of Solid Tumors**, v.2, n.1, p.22-5, 2012.

HOPP R.N., LIMA N.C.S., FILHO J., SENA-FILHO M., LIMA C.S.P., JORGE J. Digit ratio (2D:4D) is associated with gastric cancer. **Early Human Development**, v.89, n.5, p.327-29, 2013.

HOPP R.N., LIMA N.C.S., FILHO J., SENA-FILHO M., SAMUEL R.O., AMARAL J.G. et al. Digit ratio (2D:4D) and cancer: What is known so far? **International Journal Cancer Therapy Oncology**, v.2, n.1, p.1-4, 2014.

HOPP R.N., LIMA N.C.D.S., FILHO M.S., FILHO J.L.F., Jorge J. Digit ratio is associated with colorectal cancer. **Journal of Gastrointestinal Digestory System**, v. 5, n.253, p.1-4, 2015.

HOPP R.N. **Correlação entre a proporção 2D:4D e o desempenho acadêmico em alunos de odontologia** [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2012.

HOWLADER N. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011**. National Cancer Institute. [Internet]. 2017 Jun. [citado 2017 Jun 28]. Disponível em: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2011/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/), 2014

HOZYASZ K.K., MOSTOWSKA A., WOJCICKI P., LASOTA A., OFFERT B., BALCEREK A., DUNIN-WILCZYN'SKA I., JAGODZIN'SKI P.P. Nucleotide variants of the cancer predisposing gene CDH1 and the risk of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. **Familial Cancer**, v. 13, n.3, p. 415-21, 2014.

HUNGER SP, MULLIGHAN CG. **Acute Lymphoblastic Leukemia in Children**, New England Journal of Medicine, v. 373, p.1541-1552, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA – INCA. **Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade**, [Internet]. Rio de Janeiro. 2016 [citado 2015 Set 20]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/wcm/incidencia/2017/introducao.asp>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2010. **Cidade: Montes Claros – Minas Gerais**. [Internet]. 2010 [citado 2017 Ago 11]. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=314330>

JESCHKE J., VAN NESTE L., GLOCKNER S.C., DHIR M., CALMON M.F., DEREGOWSKI V. et al. Biomarkers for detection and prognosis of breast cancer identified by a functional hypermethylation screen. **Epigenetics**, v.7, p.701-9, 2012.

JINDAL A., VIEIRA A.R. Family history of cleft lip and palate in subjects diagnosed with leukemia. **American Journal of Human Genetics**, v. 158A, n.3, p.678-79, 2012.

JUNG H., KIM K.H., YOON S.J., KIM T.B. Second to fourth digit ratio: a predictor of prostate-specific antigen level and the presence of prostate cancer. **BJU International**, v.107, n.104, p.591-596, 2010.

KEBRIAIEI P., LARSON R.A. Progress and challenges in the therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Current Opinion in Hematology**, v.10, n.4, p.284-89, 2003.

KEMPER C.J., SCHWERDTFEGER A. Comparing indirect methods of digit ratio (2D:4D) measurement. **American Journal of Human Biology**, v.21, n.2, p.188-91, 2009.

KUCHLER E.C., SABOIA T.M., VIEIRA T.C., LIPS A., TANNURE P.N., DEELEY K. et al. Studies of genes involved in craniofacial development and tumorigenesis: FGF3 contributes to isolated oral clefts and may interact with PAX9. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 72, n.8, p.1070-8, 2014.

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

LIDRAL A.C., MORENO L.M., BULLARD A.S. Genetic factors and orofacial clefting. **Seminars in Orthodontics**, v.14, n.2, p.103-14, 2008.

LIM J.Y., BHATIA S., ROBISON L.L., YANG J.J. Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v.120, n.7, p.955-62, 2014.

LIMA L.S., SILVÉRIO M.O., Swerts M.S.O., Aquino S.N., Martelli D.R., Martelli Júnior H. 2013. Frequency of cancer in first-degree relatives of patients with cleft lip and/or palate in the Brazilian population. **Brazilian Dental Journal**, v.24, n.3, p.200-203, 2013.

LUTCHMAYA S., BARON-COHEN S., RAGGATT P., KNICKMEYER R., MANNING J.T. 2nd to 4th digit ratios, fetal testosterone and estradiol. **Early Human Development**, v.77, n.1-2, p.23-28, 2004.

MACHADO R.A., DE FREITAS E.M., DE AQUINO S.N., MARTELLI D.R., SWERTS M.S, REIS SR, et al. Clinical relevance of breast and gastric cancer-associated polymorphisms as potential susceptibility markers for oral clefts in the Brazilian population. **BMC Medical Genetics**, v.18, n.1, p.39, 2017.

MANNING J.T., BUNDRED P.E. The ratio of 2nd to 4th digit length: a new predictor of disease predisposition? **Medical Hypotheses**, v.54, p.855-57, 2000.

MANNING J.T., CALLOW M., BUNDRED P.E. Finger and toe ratios in humans and mice: implications for the aetiology of diseases influenced by HOX genes. **Medical Hypotheses**, v.60, n.3, p.340-3, 2003..

MANNING J.T., FINK B., NEAVE N., CASWELL N. Photocopies yield lower digit ratios (2D:4D) than direct finger measurements. **Archive Sexual Behavior**, v.34, n.3, p.329-33, 2005.

MANNING J.T., LEINSTER S. The ratio of 2nd to 4th digit length and age at presentation of breast cancer: a link with prenatal oestrogen. **Breast**, v.22, p.61-9, 2001.

MANNING J.T., SCUTT D., WILSON J., LEWIS-JONES. The ratio of 2nd to 4th digit length: a predictor of sperm numbers and concentrations of testosterone, luteinizing hormone and oestrogen. **Human Reproduction**, v.13, n.11, 3000-4, 1998.

MANNING J.T., STEWART A., BUNDRED P.E., Trivers R.L. Sex and ethnic differences in 2nd to 4th digit ratio of children. **Early Human Development**, v.80, n.2, p.161-8, 2004.

MARTELLI D.R.B, MACHADO RA, SWERTS MS, RODRIGUES LA, AQUINO SN, MARTELLI JÚNIOR H. Non syndromic cleft lip and palate: relationship between sex and clinical extension. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.78, n.5, p.116-20, 2012.

MARTELLI D.R., VIEIRA A.R., FONSECA A.T., COLETTA R.D., SOARES P.B., MARTELLI JÚNIOR H. Risk of nonsyndromic cleft lip and palate in relatives of women with breast cancer. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v.164, n.1, p.270-271, 2014.

MARTELLI-JÚNIOR H., BONAN P.R., SANTOS R.C., BARBOSA D.R., SWERTS M.S., COLETTA R.D. An epidemiologic study of lip and palate clefts from a Brazilian reference hospital. **Quintessence International**, v.39, n.9, p.749-52, 2008.

MARTELLI-JUNIOR H., PORTO L.V., MARTELLI D.R., BONAN P.R., FREITAS A.B., DELLA COLETTA R. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000–2005. **Brazilian Oral Research**, v.21, n.4, p.314-17, 2007.

MENEZES R., LETRA A., KIM A.H., KUCHLER E.C., DAY A., TANNURE P.N., et al. Studies with WNT genes and nonsyndromic cleft lip and palate. **Birth Defects Research. Part A Clinical and Molecular Teratology**, v.88, n.11, p.995-1000, 2010.

MENEZES R., MARAZITA M.L., GOLDSTEIN MCHENRY T., COOPER M.E., BARDI K., et al. AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. **Journal of the American Dental Association**, v.140, n.1, 80-4, 2009.

MENDES P.H.C., MARTELLI D.R.B., COSTA S.M., GONÇALVES E., MACEDO CP, SILVEIRA M.F., et al. Comparison of digit ratio (2D:4D) between Brazilian men with and without prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v.19, n.1, p. 107-110.2016.

MCINTYRE M.H., COHN B.A., ELLISON P.T. Sex dimorphism in digital formulae of children. **American Journal of Physical Anthropology**, v.129, n.1, p.143-50, 2006.

MOOSEY P.A. The heritability of malocclusion: Part I – genetics, principles and terminology. **Brazilian Journal of Orthodontics**, v.26, n.2, p.103-13, 1999.

MULLER D.C., BAGLIETTO L., MANNING J.T., MCLEAN C., HOPPER J.L., ENGLISH D.R., GILES G.G., SEVERI G. Second to fourth digit ratio (2D:4D), breast cancer risk factors, and breast cancer risk: a prospective cohort study. **British Journal of Cancer**, v.107, 9, p.1631-36, 2012.

MULLER D.C., GILES G.G., BASSETT J., MORRIS H.A., MANNING J.T., HOPPER J.L. et al. Second to fourth digit ratio (2D:4D) and concentrations of circulating sex hormones in adulthood. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.9, p.1-11, 2011.

NASSIF A., SENUSSI I., MEARY F., LOIODICE S., HOTTON D., ROBERT B., et al. Msx1 role in craniofacial bone morphogenesis. **Bone**, v.66, p.96-104, 2014.

NEYSE L., BRAÑAS-GARZA P. **Digit ratio measurement guide**. Munich Personal RePEc Archive, 2014.

NGUYEN L.V., VANNER R., DIRKS P., EAVES C.J. Cancer stem cells: an evolving concept. **Nature Reviews. Cancer**, v.12, n.2, p.133-43, 2012.

NISHI M., MIYAKE H., TAKEDA T., HATAE Y. Congenital malformations and childhood cancer. **Medical and Pediatric Oncology**, v.34, n.4, p.250-54, 2000.

NUNES F.D., ALMEIDA F.C.S., TUCCI R., SOUSA S.C.O.M. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n.1, p.94-98, 2003.

OH J.K., KIM K.H., JUNG H., YOON S.J., KIM T.B. Second to fourth digit ratio: its relationship with core cancer volume and Gleason score in prostate biopsy. **International Brazilian Journal of Urology**, v.38, n.5, p.611-19, 2012.

OWENS B.M., HAWLEY R.G. *HOX* and *Non-HOX* Homeobox genes in leukemic hematopoiesis. **Stem Cells**, v.20, n.5, p.364-79, 2002.

PARANAÍBA L.M., MIRANDA R.T., MARTELLI D.R., BONAN P.R., ALMEIDA H., ORSI JÚNIOR J.M., MARTELLI JÚNIOR H. Cleft lip and palate: series of unusual clinical cases. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.76, n.5, p.649-53, 2010.

POMBO-DE-OLIVEIRA M.S., KOIFMAN S. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.15, n.12, p.2336-41, 2006.

POPOFF D.A.V., COELHO M.P., MARTELLI D.R.B., SAINI R., COLETTA R.D., MARTELLI-JUNIOR H. Non-syndromic oral clefts and risk of cancer: a systematic review. **Dentistry**, v.1, n.1, p.1-7, 2013.

POTISCHMAN N., TROISI R., THADHANI R., HOOVER R.N., DODD K., DAVIS W.W., *et al.* Pregnancy hormone concentrations across ethnic groups: implications for later cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.14, n.6, p.1514-20, 2005.

PUI C.H., ROBISON L.L., LOOK A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v.371, p.1030-43, 2008.

PUSSILA M., SARANTOUS L., DERMADI BEBEK D., VALO S., REYHANI N., OLLILA S., *et al.* Cancer-predicting gene expression changes in colonic mucosa of Western diet fed Mlh1+/- mice. **PLoS One**, v.8, n.10, p. e76865, 2013.

RAHMAN A.A., LOPHATANANON A., STEWART-BROWN S., HARRISS D., ANDERSON J., PARKER T., *et al.* Hand pattern indicates prostate cancer risk. **British Journal of Cancer**, v.104, n.1, p.175-77, 2011.

RIBEIRO E., NEAVE N., MORAIS R.N., MANNING J.T. Direct versus indirect measurement of digit ratio (2D:4D): a critical review of the literature and new data. **Evolutionary Psychology**, v.14, n.1, p.1-8, 2016.

RIBEIRO K.B., LOPES L.F., DE CAMARGO B. Trends in childhood leukemia mortality in Brazil and correlation with social inequalities. **Cancer**, v.110, n.8, p.1823-31, 2007.

SCHNYDER S., DU N., LEA H., SINGH S., LOREDO G., VAUGHAN A. Estrogen treatment induces MLL aberrations in human lymphoblastoid cells. **Leukemia Research**, v.33, n.10, p.1400-04, 2009.

SPINA V. A proposed modification for the classification of cleft lip and palate. **The Cleft Palate Journal**, v.10, p.251-2, 1973.

STEINWACHS E., AMOS C., JOHNSTON D., MULLIKEN J., HECHT J. Nonsyndromic cleft lip and palate is not associated with cancer or other birth defects. **American Journal of Medical Genetics**, v.90, v.1, p.17-24, 2000.

SWERDLOW S.H., CAMPO E., HARRIS N.L., JAFFE E.S., PILERI S.A., STEIN H., *et al.* World Health Organization classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. **Lyon: IARC Press**; 2008.

TAIOLI E., RAGIN C., ROBERTSON L., LINKOV F., THURMAN N.E., VIEIRA A.R. Cleft lip and palate in family members of cancer survivors. **Cancer Investigation**, v.28, n.9, p.958-62, 2010.

TRIVERS R., MANNING J., JACOBSON A. A longitudinal study of digit ratio (2D:4D) and other finger ratios in Jamaican children. **Hormones and Behavior**, v.49, 2, p.150-6, 2006.

VIEIRA A.R., KHALIQ S., LACE B. Risk of cancer in relatives of children born with isolated cleft lip and palate. **American Journal of Medical Genetics**, v.158, n.6, p.1503-4, 2012.

VORACEK M., MANNING J.T., DRESSLER S.G. Repeatability and interobserver error of digit ratio (2D:4D) measurements made by experts. **American Journal of Human Biology**, v.19, n.1, p. 142-46, 2007.

ZHENG Z., COHN M.J. Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 39, p. 16289-94, 2011.

ZHU J.L., BASSO O., HASLE H., WINTHER J.F., OLSEN J.H., OLSEN J. Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? A nationwide study in Denmark. **British Journal of Cancer**, v. 87, n. 5, p. 524-28, 2002.

ZHOU B., SHAN H., SU Y., XIA K., SHAO X., MAO W., et al. The association of APE1 - 656T > G and 1349 T > G polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 37 case-control studies. **BMC Cancer**, v.11, p. 521, 2011.



## APÊNDICES

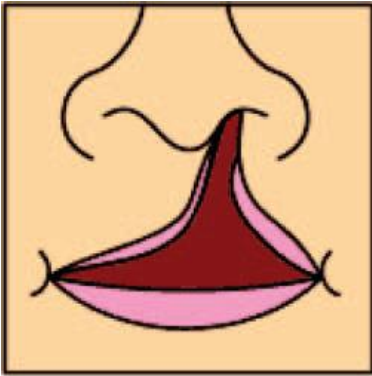
## APÊNDICE A - Instrumento de Coleta de Dados

1. Nome:	Prontuário:		
2. Gênero:	0. Masculino <input type="checkbox"/>	1. Feminino <input type="checkbox"/>	Data:
3. Data Nascimento:	____/____/____		( ) anos
4. Nacionalidade:	Local de atendimento:		
5. Naturalidade:			
6. Cor da pele:	0. Leucoderma <input type="checkbox"/>	1. Melanoderma <input type="checkbox"/>	2. Feoderma <input type="checkbox"/>
	3. Xantoderma <input type="checkbox"/>		
7. 0. Destro <input type="checkbox"/> 1. Canhoto <input type="checkbox"/>			
8. Você sofreu alguma fratura nos dedos anular ou indicador? 0. Sim <input type="checkbox"/> 1. Não <input type="checkbox"/>			
9. Consangüidade na família:	0. Positiva <input type="checkbox"/>		1. Negativa <input type="checkbox"/>
10. Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	0. Sim <input type="checkbox"/>		1. Não <input type="checkbox"/>
10.1 Idade do paciente no momento do diagnóstico: .....	10.2 Estadiamento : .....		
10.3 Presença de metástase: 0. Sim <input type="checkbox"/> 1. Não <input type="checkbox"/>	10.4 Qual órgão:.....		
11. Histórico de LLA em parente de primeiro grau: 0. Sim <input type="checkbox"/> 1. Não <input type="checkbox"/>	11.1 Especifique:.....		
12. Idade gestacional ao nascimento: .....semanas	0. <37 SEMANAS <input type="checkbox"/>		
	1. 37-41 <input type="checkbox"/>		
	2. ≥42 <input type="checkbox"/>		
13. Peso ao nascer (g) :.....	0. <2500 <input type="checkbox"/>		
	1. 2500-3999 <input type="checkbox"/>		
	2. ≥4000 <input type="checkbox"/>		
14. Número de irmãos mais velhos.....	15. Idade materna ao nascimento (anos) .....		
16. Idade paterna ao nascimento (anos) .....			

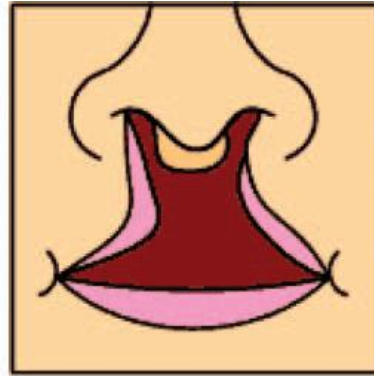
17. Anos de escolaridade da Mãe ..... 0. 9 anos ou mais <input type="checkbox"/> 1. 5 – 8 anos <input type="checkbox"/> 2. 1 – 4 anos <input type="checkbox"/> 3. Nenhum <input type="checkbox"/>	17.1 Anos de escolaridade do Pai ..... 0. 9 anos ou mais <input type="checkbox"/> 1. 5 – 8 anos <input type="checkbox"/> 2. 1 – 4 anos <input type="checkbox"/> 3. Nenhum <input type="checkbox"/>
18. Fatores de risco :  OBS:..... ..... .....	0. Exposição à Radiação <input type="checkbox"/> 1. Exposição a Produtos Químicos <input type="checkbox"/> 2. Infecções Virais <input type="checkbox"/> 3. Síndrome de Down <input type="checkbox"/> 4. Síndrome de Klinefelter <input type="checkbox"/> 5. Síndrome de Ataxia-telangiectasia <input type="checkbox"/> 6. Neurofibromatose tipo I <input type="checkbox"/> 7. Síndrome de Schwacchman <input type="checkbox"/>
19. Leucometria (mm <sup>3</sup> ).....	0. <10000 <input type="checkbox"/> 1. >10000 a <50000 <input type="checkbox"/> 2. >50000 <input type="checkbox"/> 3. Ignorada <input type="checkbox"/>
20. Imunofenótipo	0. LLA precursor B <input type="checkbox"/> 1. LLA- precursor T <input type="checkbox"/>
21. Antígeno CD 10	0. Positivo <input type="checkbox"/> 1. Negativo <input type="checkbox"/> 2. Não Realizado <input type="checkbox"/>
22. Tem histórico de Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica (FL/PNS) na família?	0. Sim <input type="checkbox"/> 1. Não <input type="checkbox"/> 99. Não sabe informar <input type="checkbox"/>
23. Se tem histórico positivo para FL/PNS, especifique o grau de parentesco.	0. Pai <input type="checkbox"/> 1. Mãe <input type="checkbox"/> 2. Irmão (a) <input type="checkbox"/> 3. Filho (a) <input type="checkbox"/> 55. Não se aplica <input type="checkbox"/> 99. Não sabe informar <input type="checkbox"/>
24. Tipo de FL/PNS	0. Fissura labial, unilateral <input type="checkbox"/> 1. Fissura labial, bilateral <input type="checkbox"/> 2. Fissura labiopalatina, unilateral <input type="checkbox"/> 3. Fissura labiopalatina bilateral <input type="checkbox"/>

	4. Fissura palatina ☐ 55. Não se aplica ☐ 99. Não sabe informar ☐
<b>25- Relação 2D:4D</b> <p style="text-align: center;"><b>MÃO DIREITA</b></p> <p><b>25.1 Primeira medida:</b>          Comprimento do dedo indicador: _____          Comprimento de dedo anelar: _____          Razão 2D: _____:_____cm          4D</p> <p><b>25.2 Segunda medida:</b>          Comprimento do dedo indicador: _____          Comprimento de dedo anelar: _____          Razão 2D: _____:_____cm          4D</p> <p>Média das razões R 2D:4D: _____</p>	
<b>26- Relação 2D:4D</b> <p style="text-align: center;"><b>MÃO ESQUERDA</b></p> <p><b>26.1 Primeira medida:</b>          Comprimento do dedo indicador: _____          Comprimento de dedo anelar: _____          Razão 2D: _____:_____cm          4D</p> <p><b>26.2 Segunda medida:</b>          Comprimento do dedo indicador: _____          Comprimento de dedo anelar: _____          Razão 2D: _____:_____cm          4D</p> <p>Média das razões L2D:4D: _____</p>	
<b>27. Relação R2D:4D:</b> a- ( ) dedo indicador maior que o dedo anelar b- ( ) dedo indicador menor que o dedo anelar c- ( ) dedo indicador de mesmo comprimento que dedo anelar	
<b>28. Relação L2D:4D:</b> a- ( ) dedo indicador maior que o dedo anelar b- ( ) dedo indicador menor que o dedo anelar c- ( ) dedo indicador de mesmo comprimento que dedo anelar	

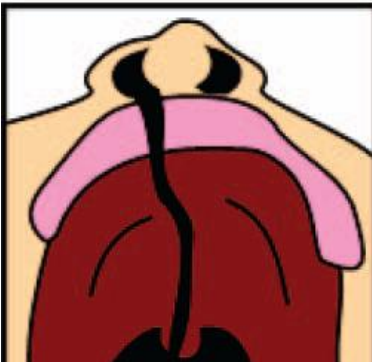
APÊNDICE B – Figura padrão para identificação das fissuras labial e/ou palatinas



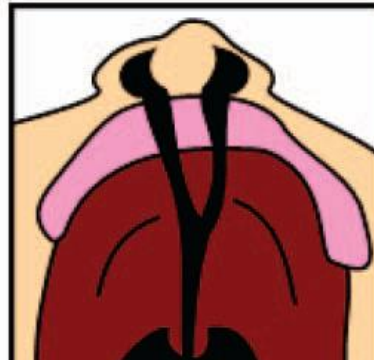
**Fissura labial, unilateral**



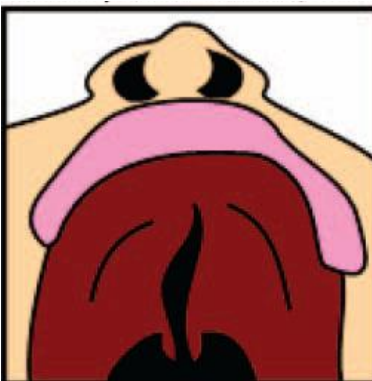
**Fissura labial, bilateral**



**Fissura labiopalatina, unilateral**



**Fissura labiopalatina, bilateral**



**Fissura palatina**

## APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participação em Pesquisa

### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

**Título da pesquisa:** Leucemia linfoblástica aguda: análise da proporção 2D:4D e prevalência de fissuras labiopalatinas não síndrômicas em parentes

**Instituição promotora:** Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes

**Patrocinador:** Daniella Reis Barbosa Martelli

**Coordenadora:** Daniella Reis Barbosa Martelli

#### **Atenção:**

Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração descreve o objetivo, metodologia/procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo. Também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis a você e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados do estudo.

**1- Objetivo:** Avaliar a possível associação entre a leucemia linfoblástica aguda, proporção 2D:4D e a ocorrência de fissura labial e/ou palatina não-sindrômica.

**2- Metodologia/procedimentos:** Será realizado a medição do comprimento em centímetros dos dedos indicador e anelar das mãos direita e esquerda, através de um paquímetro, em crianças oriundas de serviços de saúde em geral da Universidade Estadual de Montes Claros-MG, e aplicados questionários aos pais dos pacientes.

**3- Justificativa:** O desenvolvimento de estudos que busquem conhecer melhor a etiologia de doenças e agravos por meio da identificação dos fatores associados à ocorrência dos mesmos é justificada uma vez tais resultados podem servir de subsídio para sua prevenção.

**4- Benefícios:** Os resultados irão proporcionar um melhor conhecimento da etiopatogênese da leucemia linfoblástica aguda, contribuindo para a prevenção de novos casos.

**5- Desconfortos e riscos:** Será realizado somente a medição do comprimento em centímetros dos dedos indicador e anelar das mãos direita e esquerda, através de um paquímetro. Assim, este exame não oferece qualquer risco aos mesmos, porém caso haja algum incômodo ou similar, os examinadores estarão prontamente atentos e à disposição para suspensão do exame e qualquer intervenção clínica necessária para o completo bem estar dos sujeitos da pesquisa.

**6- Danos:** Não existem.

**7- Metodologia/procedimentos alternativos disponíveis:** Não existem.

**8- Confidencialidade das informações:** Os dados individuais não serão divulgados em nenhuma hipótese.

**9- Compensação/indenização:** Não se aplica.

**10- Outras informações pertinentes:** Não existem.

**11- Consentimento:** Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando meu consentimento para participar nesta pesquisa, até que eu decida o contrário. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

_____	_____	_____
Nome do participante	Assinatura do participante	Data
_____	_____	_____
Nome da testemunha	Assinatura da testemunha	Data
<u>Daniella Reis Barbosa Martelli</u>	<u>DAB Martelli</u>	<u>01/12/2015</u>
Nome do coordenador da pesquisa	Assinatura do coordenador da pesquisa	Data

**ENDEREÇO DO PESQUISADOR:** Rua Olegário Silveira, 125, apt. 201, Centro, Montes Claros.  
**TELEFONE:** 38 991988555/ 31 986869659 / 38 22248379

## APÊNDICE D - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para Participação em Pesquisa

### TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

#### Informação para o(a) pesquisador(a)

**Termo de Assentimento** - documento elaborado em linguagem acessível para os menores de idade ou para os legalmente incapazes, por meio do qual, após os participantes da pesquisa serem devidamente esclarecidos, explicitarão sua anuência em participar da pesquisa, sem prejuízo do consentimento de seus responsáveis legais (Resolução 196 revisada em 2012 – Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasil).

Título da pesquisa: **Leucemia linfoblástica aguda: análise da proporção 2D:4D e prevalência de fissuras labiopalatinas não síndrômicas em parentes.**

Instituição promotora: **Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes**


Coordenador(a): **Daniella Reis Barbosa Martelli**

#### Atenção:

Antes de aceitar participar desta pesquisa, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração descreve o objetivo, metodologia/procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo. Também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis a você e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados do estudo.

- Objetivo:** Avaliar a possível associação entre a leucemia linfoblástica aguda, proporção do tamanho dos dedos e a ocorrência de fissura labial e/ou palatina não-sindrômica.
- Metodologia/procedimentos:** Será realizado a medição do comprimento dos dedos indicador e anelar das mãos direita e esquerda, em crianças de serviços de saúde em geral da Universidade Estadual de Montes Claros-MG, e aplicados questionários aos pais dos pacientes.
- Justificativa:** O desenvolvimento de estudos que busquem conhecer melhor a causa de doenças por meio da identificação dos fatores associados à ocorrência dos mesmos é justificada uma vez tais resultados podem servir para sua prevenção.
- Benefícios:** Os resultados irão proporcionar um melhor conhecimento sobre leucemia linfoblástica aguda, contribuindo para a prevenção de novos casos.
- Desconfortos e riscos:** Será realizado somente a medição do comprimento em centímetros dos dedos indicador e anelar das mãos direita e esquerda. Assim, este exame não oferece qualquer risco aos mesmos, porém caso haja algum incômodo ou similar, os examinadores estarão prontamente atentos e à disposição para suspensão do exame e qualquer intervenção clínica necessária para o completo bem estar dos sujeitos da pesquisa.
- Danos:** Não existem.
- Metodologia/procedimentos alternativos disponíveis:** Não existem.
- Confidencialidade das informações:** Os dados individuais não serão divulgados em nenhuma hipótese.
- Compensação/indenização:** Não se aplica.
- Outras informações pertinentes:** Não existem.

**Assentimento:** Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando meu consentimento para participar nesta pesquisa, até que eu decida o contrário. Receberei uma cópia assinada deste assentimento.

Nome do participante	Assinatura do participante	Data
Daniella Reis Barbosa Martelli		01/19/2015
Nome do(a) coordenador(a) da pesquisa	Assinatura do coordenador da pesquisa	Data

Endereço do(a) Pesquisador(a): Rua Olegário Silveira, 125, apt. 201, Centro, Montes Claros

## ANEXOS

## ANEXO A - Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Montes Claros.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MONTES CLAROS -  
UNIMONTES

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Leucemia linfoblástica aguda: análise da proporção 2D:4D e prevalência de fissuras labiopalatinas não sindrômicas em parentes

**Pesquisador:** Daniella Reis Barbosa Martelli

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 51956315.8.0000.5146

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.416.786

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo epidemiológico retrospectivo do tipo caso-controle. Estudo não-invasivo e não compreenderá aplicação de terapêutica medicamentosa. Este estudo envolverá dois grupos, o grupo caso com 40 pacientes com leucemia linfoblástica aguda e o grupo controle com 40 sujeitos sem a doença ou histórico familiar de neoplasias hematológicas em primeiro grau. Os sujeitos do grupo caso e do grupo controle serão oriundos de serviços de saúde em geral da Universidade Estadual de Montes Claros-MG. Será realizado o pareamento dos grupos experimentais por idade e gênero (masculino e feminino). A coleta de dados envolverá medição do comprimento, em centímetros, dos dedos indicador e anelar das mãos direita e esquerda, através de um paquímetro, em dois momentos e aplicação de um questionário.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a possível associação entre a leucemia linfoblástica aguda, proporção 2D:4D e a ocorrência de fissura labial e/ou palatina não-sindrômica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Será realizado somente a medição do comprimento em centímetros dos dedos indicador e anelar das mãos direita e esquerda. Esse exame não oferece qualquer risco aos mesmos, porém

**Endereço:** Av. Dr Rui Braga s/n-Camp Univers Profº Darcy Rib

**Bairro:** Vila Mauricéia

**CEP:** 39.401-089

**UF:** MG

**Município:** MONTES CLAROS

**Telefone:** (38)3229-8180

**Fax:** (38)3229-8103

**E-mail:** smelocosta@gmail.com

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MONTES CLAROS -  
UNIMONTES



Continuação do Parecer: 1.416.786

caso haja algum incômodo ou similar, os examinadores estarão prontamente atentos e à disposição para suspensão do exame e qualquer intervenção clínica necessária para o completo bem estar dos sujeitos da pesquisa.

Benefícios: Os resultados irão proporcionar um melhor conhecimento sobre leucemia linfoblástica aguda, contribuindo para a prevenção de novos casos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa importante na área da saúde e que poderá contribuir na verificação da possível associação entre a leucemia linfoblástica aguda, proporção 2D:4D e a ocorrência de fissura labial e/ou palatina não-sindrômica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

**Recomendações:**

Apresentação de relatório final por meio da plataforma Brasil, em "enviar notificação".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O projeto respeita os preceitos éticos da pesquisa em seres humanos, sendo assim somos favoráveis à aprovação do mesmo.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_636524.pdf	16/12/2015 14:53:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Leucemia_linfoblastica_aguda.docx	16/12/2015 14:52:00	João Vitor Quadros Tonelli	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_FISICO.docx	16/12/2015 14:51:06	João Vitor Quadros Tonelli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_pesquisadores.pdf	01/12/2015 12:15:52	Daniella Reis Barbosa Martelli	Aceito
Declaração do Patrocinador	recursos_proprios.pdf	01/12/2015 12:07:30	Daniella Reis Barbosa Martelli	Aceito

**Endereço:** Av. Dr Rui Braga s/n-Camp Univers Profº Darcy Rib

**Bairro:** Vila Mauricéia **CEP:** 39.401-089

**UF:** MG **Município:** MONTES CLAROS

**Telefone:** (38)3229-8180 **Fax:** (38)3229-8103 **E-mail:** smelocosta@gmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MONTES CLAROS -  
UNIMONTES



Continuação do Parecer: 1.416.786

Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMO_DE_CONCORDANCIA.docx	01/12/2015 11:53:27	Daniella Reis Barbosa Martelli	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	01/12/2015 11:51:33	Daniella Reis Barbosa Martelli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_consentimento.docx	01/12/2015 11:44:12	Daniella Reis Barbosa Martelli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_assentimento.docx	01/12/2015 11:38:46	Daniella Reis Barbosa Martelli	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.docx	01/12/2015 11:36:46	Daniella Reis Barbosa Martelli	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MONTES CLAROS, 20 de Fevereiro de 2016

Assinado por:  
**SIMONE DE MELO COSTA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Dr Rui Braga s/n-Camp Univers Profº Darcy Rib  
**Bairro:** Vila Mauricéia **CEP:** 39.401-089  
**UF:** MG **Município:** MONTES CLAROS  
**Telefone:** (38)3229-8180 **Fax:** (38)3229-8103 **E-mail:** smelocosta@gmail.com

## ANEXO B – Normas para publicação no periódico *Early Human Development*

### **Aims and scope**

The aim of this peer-reviewed interdisciplinary journal is to provide a forum in which papers concerned with early human growth and development are gathered. The emphasis is on the continuum of fetal life, the problems of the perinatal period and those aspects of postnatal growth which are influenced by early events; and on the safe-guarding of the quality of human survival

### **Manuscript Length and Type**

Papers should deal with original research not previously published or being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to the journal carries with it the permission for the journal to publish that paper. The main object of the journal is the publication of original research papers with application to the human species. These should appeal to clinicians and research workers alike. Manuscripts will be considered for publication in the following fields: obstetrics; reproduction and fertility; fetal medicine and surgery; perinatology; paediatric growth and development; teratology; developmental neurology; and psychology. Papers from other fields or studies on other species will also be considered, if they are related to early human development.

1. Full length research papers should include a summary of not more than 250 words. The papers should be divided into sections, and should not normally exceed 10 printed pages.
2. Short communications should provide a brief but complete account of a particular piece of work, and will be limited to 4 printed pages, including one figure. A summary of not more than 50 words should be included.
3. Review articles are usually published after an invitation from the editors. They should be a survey, evaluation and critical interpretation of recent research and concepts in the fields covered by the journal. They are peer reviewed in the usual way.

4. Letters to the editor should either be on a topic of current interest, or comment upon material previously or simultaneously published in this journal. They should not normally exceed 500 words.

5. The inclusion of announcements, book reviews, etc. is at the discretion of the editors and the publishers, and subject to space availability.

For any queries regarding the submission, please contact [ehd@elsevier.com](mailto:ehd@elsevier.com)

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### **Human and animal rights**

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title

page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

### **Contributors**

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

### **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### **Author signatures**

Early Human Development will not publish a paper unless it has the signatures of all the authors at the time of submission. We suggest the following format: "I declare that I participated in the design, execution, and analysis of the paper by..... and colleagues entitled....., that I have seen and approved the final version and that it has neither been published nor submitted elsewhere. I also declare that I have no conflict of interest, other than any noted in the covering letter to the editor" These signatures need not be dated; when provided on separate sheet(s) these statements will be returned if the paper is not accepted for publication.

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### ***Reporting clinical trials***

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram are available online.

Early Human Development has adopted the proposal from the International Committee of

Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this purpose, a clinical trial is defined as any research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between a medical intervention and a health outcome. Studies designed for other purposes, such as to study pharmacokinetics or major toxicity (e.g. phase I trials) would be exempt. Further information can be found at <http://www.icmje.org>

### ***Article transfer service***

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

### ***Author rights***

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

### ***Elsevier supports responsible sharing***

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text.

Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

### ***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:



### ***Subscription***

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

### ***Open access***

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

### ***Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)***

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### ***Green open access***

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

### ***Elsevier Publishing Campus***

The Elsevier Publishing Campus ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

### **Authors in Japan please note**

If you would like information about how to have the English of your paper checked, corrected and improved (before submission), please contact our Tokyo office who will inform you of the services provided by language correctors: Elsevier Japan, 20-12 Yushima 3-chome, Bunkyo, Tokyo 113; Tel:(03) 5561 5033 and Fax:(03) 5561 5047; E-mail: [info@elsevier.co.jp](mailto:info@elsevier.co.jp)

### **Informed consent and patient details**

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the

next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

## **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### ***Submit your article***

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/ehd/default.asp>.

### ***Referees***

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **Peer review**

This journal operates a double blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

### **Double-blind review**

This journal uses double-blind review, which means the identities of the authors are concealed from the reviewers, and vice versa. More information is available on our website. To facilitate this, please include the following separately:

*Title page (with author details):* This should include the title, authors' names, affiliations, acknowledgements and any Declaration of Interest statement, and a complete address for the

corresponding author including an e-mail address.

*Blinded manuscript (no author details):* The main body of the paper (including the references, figures, tables and any acknowledgements) should not include any identifying information, such as the authors' names or affiliations.

## **Article structure**

### **Structure of manuscripts**

For the initial submission of manuscripts for consideration it is essential to send via EVISE your text, tables, legends and figures. The manuscript must be in English. The manuscripts should be typed with double spacing with wide margins on one side of the paper only; full length papers should be divided into sections (such as introduction, methods, results and discussion). The author's full names and academic addresses should be given on the title page, as well as an address for correspondence.

Although minor alterations to the English can be made in the editorial office it is important that authors whose first language is not English should have the paper checked by a native English speaker before submission.

### ***Subdivision - unnumbered sections***

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### ***Material and methods***

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

## ***Results***

Results should be clear and concise.

## ***Appendices***

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## **Essential title page information**

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## **Structured Abstract**

Structured Abstract not exceeding 250 words should be given at the beginning of the paper. The Abstract should include: background, aims, study design, subjects, outcome measures, results and conclusions.

**Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

***Abbreviations***

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Artwork**

#### ***Electronic artwork***

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

##### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a

minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

***Illustration services***

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

***Figures***

Figures initially should be submitted in print in black and white, or colour on a plain sheet of paper, or glossy photographs. Three copies are required of each figure. The legends should be typed with double spacing, on a separate sheet. After final acceptance the legends and graphics can be submitted in electronic format and the instructions will be sent with the letter of acceptance.

***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of



the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

## **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Tables should be typed, with double spacing, each on a separate sheet, numbered consecutively with arabic numerals, and should only contain horizontal lines. A short descriptive heading should be given above each table, and any footnotes and explanations underneath.

## **References**

References should be in the Vancouver style. For more details refer Reference Style

### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### ***Reference links***

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and

pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### ***Reference management software***

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/early-human-development>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### ***Reference style***

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015.

<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### ***Journal abbreviations source***

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

## **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB in total. Any single file should not exceed 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

## **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

## **RESEARCH DATA**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles.

Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

### ***Data linking***

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### ***Mendeley Data***

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals](#) page.

### ***Data statement***

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement](#) page.

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.



### **After Acceptance**

#### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only

be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

ANEXO C – Normas para publicação no periódico *International Journal of Paediatric Dentistry*

## **Author Guidelines**

### **Content of Author Guidelines:**

**Relevant Documents:** Sample Manuscript

### **CrossCheck**

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

### **1. GENERAL**

*International Journal of Paediatric Dentistry* publishes papers on all aspects of paediatric dentistry including: growth and development, behaviour management, prevention, restorative treatment and issue relating to medically compromised children or those with disabilities. This peer-reviewed journal features scientific articles, reviews, clinical techniques, brief clinical reports, short communications and abstracts of current paediatric dental research. Analytical studies with a scientific novelty value are preferred to descriptive studies.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after acceptance of a manuscript for publication in *International Journal of Paediatric Dentistry*. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

In June 2007, the Editors gave a presentation on How to write a successful paper for the *International Journal of Paediatric Dentistry*.

### **2. ETHICAL GUIDELINES**

Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere; that authors have read and approved the content, and all authors have also declared all competing interests; and that the work complies with the Ethical Policies of the Journal and has been conducted under internationally accepted



ethical standards after relevant ethical review.

### **3. CONFLICT OF INTEREST AND SOURCE FUNDING**

Journal of Oral Rehabilitation requires that all authors (both the corresponding author and co-authors) disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. If authors are unsure whether a past or present affiliation or relationship should be disclosed in the manuscript, please contact the editorial office at [IJPDedoffice@wiley.com](mailto:IJPDedoffice@wiley.com). The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

The above policies are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>). It is the responsibility of the corresponding author to have all authors of a manuscript fill out a conflict of interest disclosure form, and to upload all forms together with the manuscript on submission. The disclosure statement should be included under Acknowledgements. Please find the form below:

Conflict of Interest Disclosure Form

### **4. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE**

Articles for the *International Journal of Paediatric Dentistry* should be submitted electronically via an online submission site. Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. Support is available by phone (+1 434 817 2040 ext. 167) or here. If you cannot submit online, please contact Daricel Borja in the Editorial Office by e-mail [IJPDedoffice@wiley.com](mailto:IJPDedoffice@wiley.com).

#### **4.1. Getting Started**

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/ijpd>

\*Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.

\*If you are registering as a new user.

- After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'.

Your e-mail information is very important.

- Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'

- Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.

\*If you are already registered, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.

\*Log-in and select 'Author Center'.

## 4.2. Submitting Your Manuscript

After you have logged into your 'Author Center', submit your manuscript by clicking on the submission link under 'Author Resources'.

\* Enter data and answer questions as appropriate.

\* You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter. **Please note** that a separate *Title Page* must be submitted as part of the submission process as 'Title Page' and should contain the following:

- Word count (excluding tables)
- Authors' names, professional and academic qualifications, positions and places of work.

They must all have actively contributed to the overall design and execution of the study/paper and should be listed in order of importance of their contribution

- Corresponding author address, and telephone and fax numbers and email address

\*Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.

\*You are required to upload your files.

- Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.

- Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.

- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.

\* Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

## 4.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and a PDF document on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) is now accepted by IPD. As such manuscripts can be submitted in both .doc and .docx file types.

#### **4.4. Review Process**

The review process is entirely electronic-based and therefore facilitates faster reviewing of manuscripts. Manuscripts will be reviewed by experts in the field (generally two reviewers), and the Editor-in-Chief makes a final decision. *The International Journal of Paediatric Dentistry* aims to forward reviewers' comments and to inform the corresponding author of the result of the review process. Manuscripts will be considered for 'fast-track publication' under special circumstances after consultation with the Editor-in-Chief.

#### **4.5. Suggest a Reviewer**

*International Journal of Paediatric Dentistry* attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript and their area of expertise. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well.

#### **4.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process**

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

#### **4.7. E-mail Confirmation of Submission**

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully

in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

#### **4.8. Manuscript Status**

You can access ScholarOne Manuscripts any time to check your 'Author Center' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

#### **4.9. Submission of Revised Manuscripts**

Revised manuscripts must be uploaded within 2 months of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision. Locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision' to submit your revised manuscript. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript. All revisions must be accompanied by a cover letter to the editor. The letter must

- a) detail on a point-by-point basis the author's response to each of the referee's comments, and
- b) a revised manuscript highlighting exactly what has been changed in the manuscript after revision.

#### **4.10 Online Open**

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions,

see [http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms).

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website

at [https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

## 5. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

**Original Articles:** Divided into: Summary, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Bullet points, Acknowledgements, References, Figure legends, Tables and Figures arranged in this order. The summary should be structured using the following subheadings: Background, Hypothesis or Aim, Design, Results, and Conclusions and should be less than 200 words. A brief description, in bullet form, should be included at the end of the paper and should describe Why this paper is important to paediatric dentists.

**Review Articles:** may be invited by the Editor.

**Short Communications:** should contain important, new, definitive information of sufficient significance to warrant publication. They should not be divided into different parts and summaries are not required.

**Clinical Techniques:** This type of publication is best suited to describe significant improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches to recognised clinical challenges.

**Brief Clinical Reports/Case Reports:** Short papers not exceeding 800 words, including a maximum of three illustrations and five references may be accepted for publication if they serve to promote communication between clinicians and researchers. If the paper describes a genetic disorder, the OMIM unique six-digit number should be provided for online cross reference (Online Mendelian Inheritance in Man).

A paper submitted as a Brief Clinical/Case Report should include the following:

- a short **Introduction** (avoid lengthy reviews of literature);
- the **Case report** itself (a brief description of the patient/s, presenting condition, any special investigations and outcomes);
- a **Discussion** which should highlight specific aspects of the case(s), explain/interpret the main findings and provide a scientific appraisal of any previously reported work in the field.

- Please provide up to 3 bullet points for your manuscript under the heading: 1. Why this clinical report is important to paediatric dentists. Bullet points should be added to the end of your manuscript, before the references.

**Letters to the Editor:** Should be sent directly to the editor for consideration in the journal.

## 6. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

### 6.1. Format

**Language:** The language of publication is English. UK and US spelling are both acceptable but the spelling must be consistent within the manuscript. The journal's preferred choice is UK spelling. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

### 6.2. Structure

The whole manuscript should be double-spaced, paginated, and submitted in correct English. The beginning of each paragraph should be properly marked with an indent.

**Original Articles (Research Articles):** should normally be divided into: Summary, Introduction, Material and methods, Results, Discussion, Bullet points, Acknowledgements, References, Figure legends, Tables and Figures arranged in this order.

Please include a statement of author contributions, e.g. Author contributions: A.S. and K.J. conceived the ideas; K.J. and R.L.M. collected the data; R.L.M. and P.A.K. analysed the data; and A.S. and K.J. led the writing.

**Summary** should be structured using the following subheadings: Background, Hypothesis or Aim, Design, Results, and Conclusions.

**Introduction** should be brief and end with a statement of the aim of the study or hypotheses tested. Describe and cite only the most relevant earlier studies. Avoid presentation of an extensive review of the field.

**Material and methods** should be clearly described and provide enough detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary repeated. Use section subheadings in a logical order to title each category or method. Use this order also in the results section. Authors should have considered the ethical aspects of their research and should ensure that the project was approved by an appropriate ethical committee, which should be stated. Type of statistical analysis must be described clearly and carefully.

*(i) Experimental Subjects:* Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

*(ii) Clinical trials* should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

*International Journal of Paediatric Dentistry* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

*(iii) DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations:* Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted

without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

**Results** should clearly and concisely report the findings, and division using subheadings is encouraged. Double documentation of data in text, tables or figures is not acceptable. Tables and figures should not include data that can be given in the text in one or two sentences.

**Discussion** section presents the interpretation of the findings. This is the only proper section for subjective comments and reference to previous literature. Avoid repetition of results, do not use subheadings or reference to tables in the results section.

**Bullet Points** should include one heading:

\*Why this paper is important to paediatric dentists.

Please provide maximum 3 bullets per heading.

**Review Articles:** may be invited by the Editor. Review articles for the *International Journal of Paediatric Dentistry* should include: a) description of search strategy of relevant literature (search terms and databases), b) inclusion criteria (language, type of studies i.e. randomized controlled trial or other, duration of studies and chosen endpoints, c) evaluation of papers and level of evidence. For examples see:

Twetman S, Axelsson S, Dahlgren H et al. Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: a systematic review. *Acta Odontologica Scandinavica* 2003; 61: 347-355.

Paulsson L, Bondemark L, Söderfeldt B. A systematic review of the consequences of premature birth on palatal morphology, dental occlusion, tooth-crown dimensions, and tooth maturity and eruption. *Angle Orthodontist* 2004; 74: 269-279.

**Clinical Techniques:** This type of publication is best suited to describe significant improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches to recognised clinical challenges. They should conform to highest scientific and clinical practice standards.

**Short Communications:** Brief scientific articles or short case reports may be submitted, which should be no longer than three pages of double spaced text, and include a maximum of three illustrations. They should contain important, new, definitive information of sufficient



significance to warrant publication. They should not be divided into different parts and summaries are not required.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

### **Supplementary data**

Supporting material that is too lengthy for inclusion in the full text of the manuscript, but would nevertheless benefit the reader, can be made available by the publisher as online-only content, linked to the online manuscript. The material should not be essential to understanding the conclusions of the paper, but should contain data that is additional or complementary and directly relevant to the article content. Such information might include the study protocols, more detailed methods, extended data sets/data analysis, or additional figures (including). All material to be considered as supplementary data must be uploaded as such with the manuscript for peer review. It cannot be altered or replaced after the paper has been accepted for publication. Please indicate clearly the material intended as Supplementary Data upon submission. Also ensure that the Supplementary Data is referred to in the main manuscript. Please label these supplementary figures/tables as S1, S2, S3, etc.

Full details on how to submit supporting information, can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>

### **6.3. References**

A maximum of 30 references should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text (Vancouver System). They should be identified in the text by superscripted Arabic numbers and listed at the end of the paper in numerical order. Identify references in text, tables and legends. Check and ensure that all listed references are cited in the text. Non-refereed material and, if possible, non-English publications should be avoided. Congress abstracts, unaccepted papers, unpublished observations, and personal communications may not be placed in the reference list. References to unpublished findings and to personal communication (provided that explicit consent has been given by the sources) may be inserted in parenthesis in the text. Journal and book references should be set out as in the following

examples:

1. Kronfol NM. Perspectives on the health care system of the United Arab Emirates. *East Mediter Health J.* 1999; 5: 149-167.
2. Ministry of Health, Department of Planning. Annual Statistical Report. Abu Dhabi: Ministry of Health, 2001.
3. Al-Mughery AS, Attwood D, Blinkhorn A. Dental health of 5-year-old children in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991; 19: 308-309.
4. Al-Hosani E, Rugg-Gunn A. Combination of low parental educational attainment and high parental income related to high caries experience in preschool children in Abu Dhabi. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998; 26: 31-36.

If more than 6 authors please, cite the three first and then et al. When citing a web site, list the authors and title if known, then the URL and the date it was accessed (in parenthesis). Include among the references papers accepted but not yet published; designate the journal and add (in press). Please ensure that all journal titles are given in abbreviated form.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: [www.refman.com/support/rmstyles.asp](http://www.refman.com/support/rmstyles.asp).

#### **6.4. Illustrations and Tables**

**Tables:** should be numbered consecutively with Arabic numerals and should have an explanatory title. Each table should be typed on a separate page with regard to the proportion of the printed column/page and contain only horizontal lines

**Figures and illustrations:** All figures should be submitted electronically with the manuscript via ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central). Each figure should have a legend and all legends should be typed together on a separate sheet and numbered accordingly with Arabic numerals. Avoid 3-D bar charts.

**Preparation of Electronic Figures for Publication:** Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs)

files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting

it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

## **7. AFTER ACCEPTANCE**

### **7.1. Copyright**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

#### **For authors signing the copyright transfer agreement**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-\\_301.html](http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html)

#### **For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services <http://exchanges.wiley.com/authors/faqs--->

copyright-\_301.html and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with your Funder requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please

visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

## **7.2. Permissions**

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the publisher.

## **7.3. NIH Public Access Mandate**

For those interested in the Wiley-Blackwell policy on the NIH Public Access Mandate, please visit our policy statement