

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Edimilson Martins de Freitas

Análise de polimorfismos associados à fissura do lábio e/ou palato não sindrômica  
como marcadores de susceptibilidade para os cânceres de boca e de mama

Montes Claros  
2018

Edimilson Martins de Freitas

Análise de polimorfismos associados à fissura do lábio e/ou palato não sindrômica como marcadores de susceptibilidade para os cânceres de boca e de mama

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da 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

Montes Claros  
2018

F862a Freitas, Edimilson Martins de.  
Análise de polimorfismos associados à fissura do lábio e/ou palato não  
sindrômica como marcadores de susceptibilidade para os cânceres de  
boca e de mama [manuscrito] / Edimilson Martins de Freitas. –2018.  
105f. : il.

Inclui Bibliografia.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde /PPGCS, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior.

1. Fissura oral. 2. Câncer oral. 3. Câncer de mama. 4. Câncer de boca – *IRF6*,  
*WNT3A*, *GSK3β*, *8q24*, *WNT11*. I. Martelli Júnior, Hercílio. II. Universidade  
Estadual de Montes Claros. III. Título.

## 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

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

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

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

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenador: Professor Alfredo Mauricio Batista de Paula

Subcoordenador: Professora Marise Fagundes Silveira



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



CANDIDATO: EDIMILSON MARTINS DE FREITAS

TÍTULO DO TRABALHO: "Análise de polimorfismos associados à fissura do lábio e/ou palato não  
sindrômica como marcadores de susceptibilidade para os cânceres de boca e de mama.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças

**BANCA (TITULARES)**

PROF. DR. HERCÍLIO MARTELLI - ORIENTADOR

PROF. DR. CLAUDIOJANES DOS REIS

PROF. DR. FRANCIS BALDUINO GUIMARÃES SANTOS

PROF. DR. MÁRCIO CAMPOS OLIVEIRA

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> ANA CRISTINA DE CARVALHO BOTELHO

ASSINATURAS

**BANCA (SUPLENTES)**

PROF. DR. LUIZ FERNANDO REZENDE

PROF. DR. RENATO ASSIS MACHADO

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> ROSEANA DE ALMEIDA FREITAS

PROF. DR. ADALBERTO MOSQUEDA TAYLOR

ASSINATURAS

APROVADO(A)

REPROVADO(A)

*Dedico essa tese  
A uma flor que cresce em um jardim  
Regado pelo amor de DEUS e fonte de minha continuação.  
A você, minha Maria Helena.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela conclusão desse projeto de vida.

Agradeço a toda a minha família pelo apoio constante. Em especial aos meus pais Cecílio e Margarida pelo carinho e dedicação diários. A Janciele, um amor divino, dado a mim por Deus, agradeço profundamente.

Aos meus amigos Alex, Dus Reis e David, sempre transmitindo boas energias. A Ronize pelo ensinamento técnico. A toda equipe do Projeto de extensão da Santa Casa, em especial Dinane e Liliane pelo apoio técnico. A Du Carmo por todo carinho e dedicação prestado ao programa frente aos alunos.

Aos professores: André, Alfredo, Daniella, Lucyana, Luís, Sabina, Sergio Avelino, Verônica pelos conselhos e inspiração profissional. Em especial ao professor, amigo e irmão, Mário Melo, pelo ensinamento cotidiano.

Aos pacientes que colaboraram com o estudo sem medir esforços.

Aos grandes mestres que conheci em Piracicaba: Renato Assis Machado e Professor Ricardo D. Coletta, pela grande contribuição humana e científica, o meu, muito obrigado.

A toda equipe de Natal (RN), Hébel Cavalcanti, Edilma de Moura e a professora Roseana de Almeida e o professor Felipe Rodrigues, de Sergipe pela grande contribuição para o meu trabalho.

Meu agradecimento especial ao professor Hercílio, pela paciência, pelo ensinamento científico, pela transmissão dos conhecimentos humanos e por compreender os momentos de lutas e dificuldades.

*Na manhã de um dia em que brumava e chuviscava, parecia não acontecer coisa nenhuma. Estava-se perto do fogo familiar, na cozinha, aberta, de alpendre, atrás da pequena casa. No campo, é bom; é assim. Mamãe, ainda de roupão, mandava Maria... a estrelar ovos com torresmos e descascar os mamões maduros. Mamãe, a mais bela, a melhor.*

João Guimarães Rosa



## RESUMO

Estudos epidemiológicos têm mostrado relação entre câncer e fissura oral, principalmente pelas similaridades de fatores genéticos. Para melhor entender esta associação, este estudo caso-controle avaliou polimorfismos em genes associados às fissuras orais não sindrômicas em pacientes com cânceres de boca e de mama. As amostras foram coletadas em dois hospitais: um na região Sudeste do Brasil (Santa Casa de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais) e o outro na região Nordeste (Liga Contra o Câncer, Natal, Rio Grande do Norte). Para o grupo de estudo com câncer de boca, foram incluídos 79 pacientes com carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) e 130 controles (CCEB-Controle) e para o câncer de mama, 159 pacientes com câncer de mama (CM) e 121 mulheres controles (CM-Controle). Cinco polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos genes *IRF6* (rs642961), *WNT3A* (rs708111), *GSK3 $\beta$*  (rs9879992), 8q24 (rs987525), *WNT11* (rs1533767) foram selecionados. Os grupos de estudos foram ajustados por co-variáveis através de análise de regressão logística multifatorial usando o pacote SNPAssoc do software R. Para análise de interação SNP-SNP utilizou-se o pacote mbmdr do software R. O teste de permutação (n=1000) para correção de falso-positivos e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Os resultados mostram que o alelo variante G do SNP rs9879992 em *GSK3 $\beta$*  foi significativamente associado com o risco ( $p=0,02$ ), enquanto que no alelo A, rs1533767 em *WNT11* apresentou um efeito protetor com o câncer de boca ( $p=0,04$ ). Nenhum SNP individual foi associado com o câncer de mama. Várias interações SNP-SNP principalmente contendo os SNPs em *WNT3A*, *GSK3 $\beta$*  e *WNT11* foram associadas com os cânceres de boca e de mama. Esses resultados revelam a associação entre os SNPs em *GSK3 $\beta$*  e *WNT11* com o risco de câncer de boca, e múltiplas interações SNP-SNP envolvendo *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3 $\beta$* , 8q24, *WNT11* podem ser fatores de risco para carcinomas de boca e de mama. Estudos em populações maiores são importantes para o melhor entendimento das interações epistáticas desse grupo de genes estudado.

**Palavras-chave:** Fissura oral – Câncer Oral - Câncer de mama - *IRF6* - *WNT3A* - *GSK3 $\beta$*  - 8q24- *WNT11*.

## ABSTRACT

Epidemiological studies have shown a relationship between cancer and oral fissure, mainly due to the similarities of genetic factors. To better understand this relationship, this case-control study evaluated polymorphisms in genes associated with nonsyndromic oral clefts in patients with oral and breast cancer. The samples were collected in two hospitals: an in the southeastern region of Brazil (Santa Casa de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais) and the other in the Northeastern region of Brazil (Liga Contra o Cancer, Natal, Rio Grande do Norte). For the oral cancer group 79 patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and 130 controls (OSCC-Control), and for the breast cancer, 159 patients with breast cancer (BC) and 121 controls (BC-Control) were included. Five single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *IRF6* genes (rs642961), *WNT3A* (rs708111), *GSK3 $\beta$*  (rs9879992), 8q24 (rs987525), *WNT11* (rs1533767), representing regions associated with oral cleft, were selected. The study groups were adjusted by covariates using multivariate logistic regression analysis using the package SNPassoc in R software. For the analysis of the SNP-SNP interaction, the package mbmdr in R software (n=1,000) for false-positive correction and values of  $p < 0.05$  were considered significant. The results shows that the variate G allele of rs9879992 in *GSK3 $\beta$*  was significantly associated with oral cancer risk ( $p=0.02$ ), whereas A allele rs1533767 in *WNT11* showed a protective effect against it ( $p=0.04$ ). No individual SNP was associated with breast cancer. Several SNP-SNP interactions principally containing SNPs in *WNT3A*, *GSK3 $\beta$*  and *WNT11* were associated with oral and breast cancer. These results reveal associations between SNPs in *GSK3 $\beta$*  and *WNT11* with oral cancer risk, and multiple SNP-SNP interactions involving *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3 $\beta$* , 8q24 and *WNT11* in the risk of both oral and breast cancer. Studies in larger populations are important for a better understanding of the epistatic interactions of this group of genes studied.

**Keywords:** Oral cleft - Breast cancer - Oral cancer - *IRF6* - *WNT3A* - *GSK3B* - 8q24-*WNT11*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Figuras utilizadas para identificação das fissuras labial e/ou palatinas apresentadas nas entrevistas clínicas.....	18
Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, no Brasil, estimados para 2018 por sexo (exceto pele não melanoma).....	23
Quadro 1 - Características dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs).....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCE	Carcinoma de células escamosas
CCEB	Carcinoma de células escamosas de boca
CM	Câncer de mama
CCEB-Controle	Grupo controle de carcinoma de células escamosas de boca
CM-Controle	Grupo controle de câncer de mama
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FL	Fissura labial
FL/P	Fissuras do lábio e/ou palato
FLP	Fissuras lábio-palatinas
FP	Fissuras palatinas
FL/PNS	Fissura de lábio e/ou palato não sindrômicas
GWAS	Estudos de associação de larga escala genômica
HPV	Vírus do papiloma humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
WNT	Via de sinalização de <i>Wingless integrase</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivo Geral .....	17
2.2 Objetivos Específicos .....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
4 METODOLOGIA.....	36
5 PRODUTO.....	39
5.1 Artigo Científico: <i>Polymorphisms associated with oral clefts as potential susceptibility markers for oral and breast cancer.....</i>	40
6 CONCLUSÕES.....	63
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
REFERÊNCIAS .....	65
APÊNDICES .....	79
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - <i>Pesquisa câncer de boca.....</i>	79
APÊNDICE B - Instrumento de coleta de dados - <i>Pesquisa relacionada ao câncer bucal.....</i>	81
APÊNDICE C – Termo de Consentimento Informado- <i>Pesquisa de câncer de mama.....</i>	83
APÊNDICE D - Instrumento de coleta de dados - <i>Pesquisa relacionada ao câncer de mama..</i>	84
ANEXOS.....	86
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa do projeto 1.....	86
ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa do projeto 2.....	87
ANEXO C - Normas da Revista da publicação do artigo.....	89

## 1 INTRODUÇÃO

Fissura de lábio e/ou palato não sindrômicas (FL/PNS) representam as anomalias congênitas mais comuns da face, correspondendo a aproximadamente 65% de todas as malformações da região craniofacial. A etiologia das FL/PNS é multifatorial com a participação de fatores genéticos e ambientais, sendo os fatores etiológicos envolvidos nesta condição ainda pouco compreendidos (MENG *et al.*, 2009; MANGOLD *et al.*, 2011).

Câncer é um problema de saúde pública mundial. Atualmente é a segunda principal causa de morte. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no ano 2.030, haverá 27 milhões de casos novos de cânceres, 17 milhões de mortes pela doença e 75 milhões de pessoas vivendo com alguma neoplasia maligna (INCA, 2018). A carcinogênese é complexa, envolvendo interação entre fatores ambientais, estilo de vida e fatores intrínsecos ao organismo. As principais manifestações dos fatores intrínsecos são variações genéticas, mudanças na secreção hormonal e condições imunes (WARNAKULASURIYA, 2009). Esses fatores de risco parecem ser recíprocos e, portanto, necessários no prognóstico da doença. Os tipos de câncer mais prevalentes no Brasil são próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral no sexo masculino; e para o sexo feminino, mama, cólon e reto, colo do útero e pulmão, respectivamente, com exceção do câncer de pele não melanoma (INCA, 2018).

Marazita *et al.* (2012) demonstraram um risco de fissuras orais em famílias com história de câncer e um aumento do risco de câncer em pacientes com fissuras orais e seus parentes. Esta associação foi explicada porque cânceres específicos, incluindo câncer bucal e fissuras orais, podem compartilhar etiologia genética similar. Estudos envolvendo associação genética e genômica (GWAS) descreveram vários genes e *locus* em associação com fissura oral, incluindo *IRF6*, *VAX1*, *MSX1*, *FOXE1*, *MYH9*, *MAFB*, *ABCA4*, *BMP4*, *FGFR2*, *TGFA*, *TGFB3*, *MTHFR*, *GSTT1*, *PDGFC*, *FGF8*, *PVRL1*, *SUMO1*, *CRISPLD2* e as regiões 8q24 e 17q22 (MURTHY *et al.*, 2009; GROSEN *et al.*, 2010; MARAZITA *et al.*, 2012). No entanto, apenas o gene *IRF6* e a região 8q24 foram confirmadas em diferentes populações (MURTHY *et al.*, 2009; HA *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2016).

Estudos genéticos relataram associações entre tipos de câncer e polimorfismos de nucleotídeo único no *locus* 8q24. Os resultados mostraram mudanças na região 8q24 como uma causa em

cânceres de próstata, mama, cólon, ovário, bexiga e leucemia linfocítica crônica (LUDWIG *et al.*, 2012).

A via de sinalização *Wingless/integrase* (WNT) é responsável por alguns eventos celulares como migração celular, polaridade celular e organogênese embrionária, incluindo a morfogênese orofacial. Alterações nos genes da via WNT foram demonstradas em estudos envolvendo membros de famílias que tiveram câncer (MENEZES *et al.*, 2009, TAIOLI *et al.*, 2010).

Taioli *et al.* (2010) demonstraram que indivíduos com fissura oral têm história familiar de câncer mais frequente do que indivíduos sem fissura oral. Nesse mesmo estudo foi confirmada a participação de variantes polimórficas no *WNT3A* e de um polimorfismo em *GSK3B* no desenvolvimento de carcinoma de células escamosas oral.

A prevenção para redução das neoplasias malignas inclui, além de outros fatores, a identificação de mutações e/ou polimorfismos gênicos associados à neoplasia. Desse modo a associação de polimorfismos em genes previamente associados à FL/PNS em cânceres de mama e de boca é de suma importância. Uma vez que há a possibilidade de polimorfismos associados ao risco a FL/PNS sejam críticos durante a embriogênese e possam participar do desenvolvimento dos cânceres. Essa investigação amplia o conhecimento dos fatores genéticos de risco para essas duas importantes condições de saúde pública mundial. Esse conhecimento poderá, futuramente, auxiliar no entendimento da etiopatogenia das FL/PNS e cânceres, assim como possibilitar uma melhor compreensão na biologia envolvida na patogênese dessas importantes condições.

Este estudo analisou polimorfismos contidos nos genes *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3B*, *WNT11* e na região 8q24 associados à FL/PNS como possíveis marcadores de susceptibilidade aos cânceres de boca e de mama em uma população brasileira.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar polimorfismos contidos nos genes *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3B*, *WNT11* e na região 8q24 associados à fissura de lábio e/ou palato não sindrômica como possíveis marcadores de susceptibilidade para os cânceres de boca e de mama.

### 2.2 Objetivos específicos

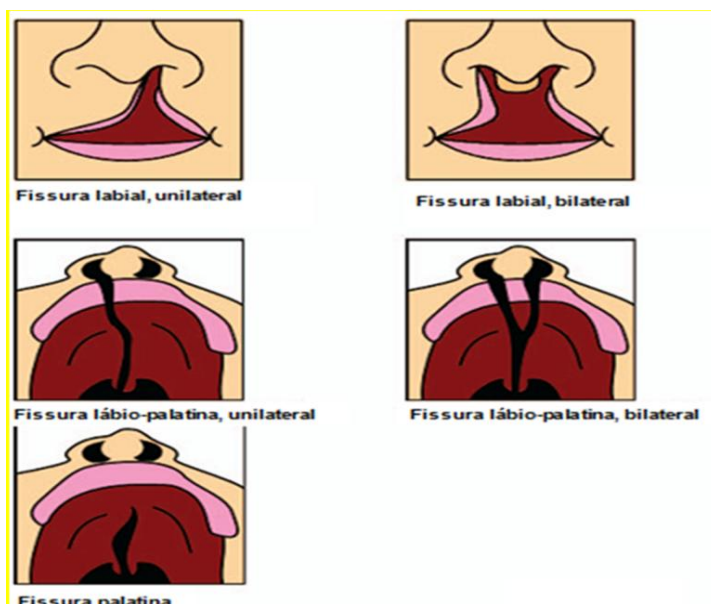
- 1) Avaliar polimorfismos em genes associados à fissura de lábio e/ou palato não sindrômica, comparando a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos rs642961, rs708111, rs9879992, rs1533767 e rs987525 contidos, respectivamente, nos genes *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3B*, *WNT11* e na região 8q24 em mulheres com câncer de mama.
- 2) Comparar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos rs642961, rs708111, rs9879992, rs1533767 e rs987525 contidos, respectivamente, nos genes *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3B*, *WNT11* e na região 8q24 em pacientes com câncer de boca.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Fissuras de lábio e/ou palato não sindrômicas

Fissuras do lábio ou palato (FL/P) são caracterizadas por áreas de descontinuidade no lábio ou palato, representando uma das anomalias congênitas mais frequentes nos seres humanos e mais comuns na região craniofacial (DIXON *et al.*, 2011; MARAZITA *et al.*, 2012). Cerca de 70% dos casos de FL/P ocorrem de forma não sindrômica (FL/PNS), ou seja, sem malformações adicionais e os demais 30% referem-se às associações em que são observadas desordens mendelianas, cromossômicas, teratogênicas e condições esporádicas. Mais de 400 síndromes já descritas apresentam FL/P como característica fenotípica no seu espectro clínico (MENG *et al.*, 2009; MANGOLD *et al.*, 2011). 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 *et al.*, 1972; GORLIN *et al.*, 2001). A figura 1 mostra a classificação das fissuras que acometem a face e a cavidade bucal.



**Figura 1:** Figuras utilizadas para identificação das fissuras labial e/ou palatinas apresentadas nas entrevistas clínicas.

Fonte: Taioli *et al.*, 2010.

As FL/PNS afetam aproximadamente 1 em cada 500 a 2.000 nativos, com ampla variabilidade de acordo com a origem geográfica, grupos étnicos, bem como exposição a fatores ambientais de risco, tais como dieta e suplementação vitamínica materna, alcoolismo, tabagismo, uso de drogas anticonvulsivantes durante o primeiro trimestre de gestação e idade materna (VIEIRA, 2008). Em geral, as populações asiáticas e ameríndias possuem uma alta prevalência (1:500), as populações européias possuem prevalência intermediária (1:1.000) e as menores taxas de prevalência são observadas em africanos e descendentes de africanos (1:2.500) (MOSSEY *et al.*, 2009; MURTHY e BHASKAR, 2009).

A frequência de FL/PNS também difere de acordo com o sexo. FLP e FL são mais frequentes no sexo masculino e a FP é mais comum no feminino (MOSSEY *et al.*, 2009). Levantamento epidemiológico realizado em Alfenas (Minas Gerais) mostrou prevalência de 1,46 casos de FL/PNS para cada 1.000 nativos, com uma maior frequência no sexo masculino (MARTELLI-JÚNIOR *et al.*, 2006). Uma maior frequência de FLP (39,68%), seguida por FL (38,09%) e pela FP (22,23%) também foi observada nos casos avaliados em estudo posterior (MARTELLI-JÚNIOR *et al.*, 2007). Estudo similar demonstrou que a FP é mais comum em mulheres, enquanto as FLP e FL foram mais frequentes no sexo masculino. E o risco de FL em relação à FP foi 2,19 vezes maior em homens quando comparados às mulheres e o risco de FLP em relação à FP foi 2,78 vezes maior em homens quando comparado às mulheres (MARTELLI *et al.*, 2012).

Apesar de não ser uma causa importante de mortalidade, as FL/PNS são associadas à significativa morbidade. Efeitos sobre a fala, audição e aparência geram resultados adversos sobre a saúde e integração social (MOSSEY *et al.*, 2009). A criança afetada necessita de cuidados multidisciplinares do nascimento até a vida adulta, que incluem enfermagem, cirurgia plástica, otorrinolaringologia, fonoaudiologia, aconselhamento genético, psicologia e odontologia (WEHBY e CASSELL, 2010). Embora a reabilitação seja possível com o atendimento multidisciplinar, as FL/P inevitavelmente constituem um ônus para o indivíduo, para a família e para a sociedade, com um custo substancial em termos de saúde e serviços relacionados (DIXON *et al.*, 2011).

Em razão da alta complexidade no desenvolvimento do lábio e palato, ainda não se conhece todos os mecanismos exatos relacionados à falha na coalescência dos processos que dão origem a essas estruturas. Estudos genéticos e epidemiológicos indicam que há participação

de fatores genéticos e ambientais na etiologia desta anomalia congênita, embora sua etiopatogenia permaneça incerta (DIXON *et al.*, 2011; MANGOLD *et al.*, 2011). Nos últimos anos, tem ocorrido uma evolução no entendimento dos fatores causais, com a identificação de novas variantes genéticas, de fatores de risco ambientais e de como os fatores de risco ambientais interagem com os fatores genéticos. Este conhecimento deve, eventualmente, resultar em melhor prevenção, tratamento e prognóstico para os indivíduos afetados (DIXON *et al.*, 2011; MANGOLD *et al.*, 2011; KOHLI e KOHLI, 2012).

Uma sequência de eventos de importante complexidade, coordenados pela interação entre fatores de transcrição e sinalizadores moleculares juntamente com interações célula-célula e aquisição de polarização celular, é essencial para o desenvolvimento normal da face (STANIER e MOORE, 2004). Durante a quarta semana de gestação, células da crista neural provenientes do tubo neural anterior migram para formar o primórdio facial. Dela surge o processo nasal medial e lateral que se fundem ao processo maxilar para formar a parte central do lábio superior, o palato primário e o nariz. O palato secundário começa a ser formado na sexta semana de gestação. Inicialmente, as placas palatinas do palato secundário aparecem como duas extensões no lado interno da maxila, ao longo da superfície lateral da língua. Na nona semana, ambas as placas palatinas sofrem uma rápida transformação horizontal, movendo-se sobre a língua e fusionando-se uma com a outra e com o septo nasal. Em seguida, o mesênquima palatino se diferencia em elementos musculares e ósseos que correlacionam com a posição do palato mole e duro, respectivamente. Na décima semana da embriogênese, os processos fusionados provenientes do palato primário e secundário e do septo nasal estão completos. Assim, o desenvolvimento do palato secundário em mamíferos divide o espaço oronasal em cavidades oral e nasal, permitindo que a mastigação e a respiração sejam realizadas simultaneamente (SPERBER, 2002).

Fogh-Andersen (1942) foi o primeiro a observar, em um estudo populacional, a existência de um componente hereditário associado ao desenvolvimento das FL/PNS. Nas últimas décadas, alguns estudos tem indicado recorrência familiar para o desenvolvimento de FL/PNS (SIVERTSEN *et al.*, 2008; GROSEN *et al.*, 2010), embora um padrão clássico de herança mendeliana não seja identificado (NATSUME *et al.*, 2000; VIEIRA *et al.*, 2008). Um estudo realizado na Dinamarca observou um aumento de 10 a 32 vezes no risco de recorrência de FL/PNS em parentes de primeiro grau (GROSEN *et al.*, 2010) e um estudo Norueguês,

avaliando 4.138 crianças com FL/PNS, identificou que o risco de recorrência de fissura em familiares de primeiro grau foi de 32% para FL e 56% para FP (SIVERTSEN *et al.*, 2008).

Estudo realizado com gêmeos demonstrou que a taxa de concordância para FL/PNS observada foi de 40 a 60% em gêmeos monozigóticos comparada com gêmeos dizigóticos (3 a 5%) (JUGESSUR *et al.*, 2008). Estudo realizado por Grozen *et al.* (2010) mostrou um risco maior para fissura em filhos de gêmeos discordantes quanto à presença de fissura, tanto para os descendentes do gêmeo com fissura quanto sem fissura, proporcionando evidência adicional para um componente genético na etiologia das FL/P. Estudo avaliando a incidência familiar de FL/PNS em 185 pacientes, identificou que 35,13% dos indivíduos apresentavam histórico familiar de FL/P, sendo os primos (54,37%) e os irmãos (21,05%) os mais afetados (MARTELLI *et al.*, 2010). Além disso, a relação entre FL/PNS e consanguinidade é observada em alguns trabalhos (KANAAAN *et al.*, 2008; LEITE e KOIFMAN, 2009; AQUINO *et al.*, 2011).

Uma variedade de estudos tem sido utilizada para identificar vias de sinalização e genes envolvidos na etiologia das FL/PNS. Parte dos genes candidatos foi sugerida através de estudos com modelos experimentais em camundongos (JURILOFF e HARRIS, 2008), citogenética (BREWER *et al.*, 1999; HIGGINS *et al.*, 2008), estudos de fissuras associadas a síndromes mendelianas (KONDO *et al.*, 2002; ZUCCHERO *et al.*, 2004) e análises de expressão gênica em tecidos embrionários (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2004; GONG *et al.*, 2005).

Em humanos, estudos genéticos utilizando diferentes estratégias, incluindo estudos de ligação, caso-controle ou com trios, sequenciamento direto do DNA e estudos de associação de larga escala genômica (GWAS), que são baseados na comparação de vários polimorfismos comuns entre casos e controles, tem identificado genes e regiões cromossômicas candidatos à etiologia das FL/PNS (DIXON *et al.*, 2011; STUPPIA *et al.*, 2011; KOHLI e KOHLI, 2012; RAHIMOV *et al.*, 2012;).

O primeiro GWAS realizado com FL/PNS identificou polimorfismos de risco na região 8q24 e no gene *IRF6* (fator regulador de interferon 6) em indivíduos de ascendência européia (BIRNBAUM *et al.*, 2009). A região 8q24 (GRANT *et al.*, 2009) e a região 1q32 também foram identificadas em associação a FL/PNS (MARAZITA *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010).

Estudos em diversas populações revelaram polimorfismos situados nos *locus* 18q22 (GRANT *et al.*, 2009) e 20q12 como marcadores de suscetibilidade ao desenvolvimento de FL/PNS (BEATY *et al.*, 2010).

Os marcadores na região 1q32, onde o gene *IRF6* está localizado (BLANTON *et al.*, 2005; SCAPOLI *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2007; RAHIMOV *et al.*, 2008; JUGESSUR *et al.*, 2008; MARAZITA *et al.*, 2009) e 8q24 são os mais consistentes, visto que foram confirmados em algumas populações (BIRNBAUM *et al.*, 2009; ROJAS-MARTINEZ *et al.*, 2010; MOSTOWSKA *et al.*, 2010; MURRAY *et al.*, 2012). Contudo, muitos dos polimorfismos encontrados nestes estudos não foram replicados em diferentes populações, indicando que a contribuição relativa dos genes pode ser variável de acordo com a etnia (MOSSEY e LITTLE, 2009; BEATY *et al.*, 2010; DIXON *et al.*, 2011). Estudos prévios na população brasileira confirmaram a associação com o *locus* 8q24 (BRITO *et al.*, 2012; PINTO, 2012). Entretanto, o envolvimento do gene *IRF6* na população brasileira permanece incerto (PARANAÍBA *et al.*, 2010; BRITO *et al.*, 2012).

Nos últimos anos estudos com abordagens diferenciadas têm sido realizados com o objetivo de identificar os genes envolvidos com a etiologia das FL/PNS. As metodologias mais recentes são baseadas em estudos de associação de larga escala genômica (GWAS), no qual polimorfismos distribuídos pelo genoma são analisados simultaneamente em pacientes afetados ou não pelas FL/PNS. Estes estudos identificaram a maior parte dos genes e regiões cromossômicas associadas à etiologia das FL/PNS conhecidas até o momento (DIXON *et al.*, 2011; STUPPIA *et al.*, 2011; KOHLI e KOHLI, 2012; LUDWIG *et al.*, 2012; RAHIMOV *et al.*, 2012; BOHMER *et al.*, 2013). Dentre as diferentes regiões cromossômicas, destacam-se a 17p13.1 (WYSZYNSKI *et al.*, 2003), 2p13, 3q27-28, 14q21-24, 16q24 (MARAZITA e MOONEY, 2004), 8p11-23 (RILEY *et al.*, 2007), 19p13.12, 19q12, 2q22.3 (VIEIRA *et al.*, 2002), 9q21, 1p32, 1q32 (MARAZITA *et al.*, 2009), 8q24.21, 18q22 (BIRNBAUM *et al.*, 2009; GRANT *et al.*, 2009), 9q22 (MORENO *et al.*, 2009; LETRA *et al.*, 2010) 10q25.3, 17q22, 2p21 (MANGOLD *et al.*, 2010), 1p22, 20q12, 1p36 (BEATY *et al.*, 2010), 6q14.2-14.3 (LETRA *et al.*, 2010) e 3p11 (LUDWIG *et al.*, 2012). No entanto, apenas 2 marcadores foram reproduzidos em diferentes populações, os quais estão localizados no gene *IRF6* e em uma região intergênica na região 8q24 (MOSTOWSKA *et al.*, 2010; ROJAS-MARTINEZ *et al.*, 2010; MURRAY *et al.*, 2012). Estudos confirmaram a associação do *locus* 8q24 na

população brasileira (BRITO *et al.*, 2012; BAGORDAKIS *et al.*, 2013), mas a participação do gene *IRF6* é discutida (PARANAIBA *et al.*, 2010; BRITO *et al.*, 2012).

### 3.2 Câncer

Câncer é uma doença multifatorial em que fatores genéticos e ambientais desempenham papéis significativos (ZHU *et al.*, 2002). Uma projeção de 27 milhões de novos casos de câncer foi estipulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o ano de 2.030 em todo o mundo, com 17 milhões de mortes pela doença (INCA, 2017).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2016 apontaram a ocorrência de aproximadamente 596 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema da doença no país. Sem os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 420.240 novos casos. Os tipos mais incidentes foram os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, cólon e reto, colo do útero e pulmão para o sexo feminino (INCA, 2017). A estimativa de novos casos de câncer de cavidade oral para o ano 2016 foi de 11.140 em homens e 4.350 em mulheres. No estado de Minas Gerais, neste mesmo ano, a estimativa foi 1.130 em homens e 480 em mulheres (INCA, 2017). A figura 2 mostra a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimados para 2018 por sexo (exceto pele não melanoma). Fonte: INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2018.

O câncer é um problema de saúde pública, por isso, a prevenção e controle para a doença tem sido amplamente estudadas envolvendo estratégias multidisciplinares (INCA, 2011). A prevenção para redução das neoplasias malignas inclui: eliminação e controle dos agentes ambientais, maior conhecimento dos carcinógenos e identificação de mutações e/ou polimorfismos gênicos (ZHU *et al.*, 2002).

### 3.3 Câncer da cavidade bucal

Câncer de cabeça e pescoço refere-se às neoplasias malignas que se desenvolvem nos lábios, cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, laringe e seios nasais e paranasais (GHAZALI e ROGERS, 2011). Na cavidade bucal, o câncer apresenta distribuição mundial com mais de 90% dos casos representados pelos carcinomas de células escamosas (CCE) e apresenta fatores de risco similares às outras doenças malignas de cabeça e pescoço, também com etiologia multifatorial (JOHNSON, JAYASEKARA e AMARASINGHE, 2011).

Mundialmente, o câncer bucal corresponde a 40% dos casos em cabeça e pescoço e mais de 95% dos casos são diagnosticados como CCE (KOWALSKI e NISHIMOTO, 2000; DEDIVITIS *et al.*, 2004). O câncer oral e de orofaringe é o sexto tipo mais comum em todo o mundo e sua distribuição geográfica é variável (WARNAKULASURIYA, 2009).

Em 2008, aproximadamente 630.000 pessoas foram diagnosticadas em todo o mundo com CCE da região de cabeça e pescoço, o que representa 6% de todas as neoplasias malignas e faz da mesma o quinto tipo de câncer mais comum (FERLAY *et al.*, 2010). No entanto, algumas regiões do Norte da França, Leste Europeu, Sul e Sudeste da Ásia e América do Sul apresentam prevalências maiores (KIMPLE *et al.*, 2014). As áreas de maior incidência de câncer de boca e faringe são o Sul e Sudeste Asiático, França, Europa Oriental e partes da América Latina e Caribe. As regiões mais afetadas na América do sul são Argentina, Sudeste do Brasil e Uruguai (WARNAKULASURIYA, 2009).

No Brasil, o INCA estimou para o ano de 2016, 15.490 novos casos, com um risco estimado de 11,27 novos casos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres, sendo mais frequente nas regiões sudeste e centro-oeste para ambos os sexos (INCA, 2017). Enquanto

que a estimativa para o ano 2030 é de 27 milhões de casos novos de cânceres, 17 milhões de mortes pela doença e 75 milhões de pessoas vivendo com alguma neoplasia maligna (INCA, 2018).

Na população brasileira, os homens são mais afetados pelo câncer de boca do que as mulheres e as regiões do Sudeste e do Sul apresentaram as maiores taxas de incidência de câncer de boca em 2014 (BRASIL, 2014). Na cavidade oral, o CCE ocorre com mais frequência na região de borda lateral posterior da língua, principalmente em homens tabagistas e/ou etilistas acima de 60 anos de idade (MOORE *et al.*, 2000).

No estado de Minas Gerais, um estudo realizado na cidade de Juiz de Fora mostrou que etilistas e fumantes com mais de 40 anos e trabalhadores com baixo nível e escolaridade foram considerados uma população vulnerável (MELO *et al.*, 2010). Em outro estudo, envolvendo outro município de Minas Gerais, Montes Claros, revelou que o grupo de estudo era principalmente formado por mulheres de baixa escolaridade com recursos financeiros limitados e mostrou que a maioria dessa população não tinha acesso a informações a serviços de câncer bucal (MARTINS *et al.*, 2012).

No período de 2009-2013 ocorreram 1420 mortes, sendo 76,9% em homens, 30,1% em indivíduos com baixa escolaridade, 81,9% em pessoas acima de dois anos e 46,5% de cor branca, para câncer de boca em Minas Gerais (FONSECA *et al.*, 2014).

A etiologia envolve vários fatores de risco, isolados ou em combinação, que incluem hábitos pessoais, profissão, fatores genéticos, epigenéticos e sociodemográficos. O consumo de álcool e tabaco é amplamente citado em diversos estudos, sobretudo para os carcinomas de orofaringe. Em outros casos, o vírus do papiloma humano (HPV) tem sido citado como fator de risco para carcinoma da cavidade bucal (WARNAKULASURIYA, 2009).

Os sítios mais frequentes do CCE de boca são a língua, assoalho da boca e lábios. Na orofaringe, o CCE acomete 90% dos casos e as localizações podem envolver palato mole, base da língua, tonsilas palatinas e parede faríngea posterior. Na Europa e nos Estados Unidos, os casos de CCE de língua correspondem a 40% a 50% dos casos (WARNAKULASURIYA, 2009). Embora o CCE possa acometer tanto a cavidade bucal



como a orofaringe, a sua etiopatogênese, o seu tratamento e o prognóstico são diferentes, já que o HPV pode está envolvido (CHI *et al.*, 2015).

Em todo o mundo, os homens são mais acometidos por câncer de boca que as mulheres e a idade de incidência é maior naqueles com mais de 50 anos. No entanto, estudos populacionais têm mostrado maior incidência em mulheres brancas com menos de 40 anos de idade e sem fatores de risco associados (HARRIS *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2011). Nos casos positivos para HPV, o perfil de pacientes com câncer de orofaringe é diferente de pacientes com câncer bucal. O grupo de pacientes com HPV associado é principalmente de brancos, mais jovens e com melhores condições socioeconômicas (CHI *et al.*, 2015).

Fatores genéticos, deficiências nutricionais, estados de imunodeficiência e fatores extrínsecos tais como tabaco, álcool, vírus do papiloma humano e exposição solar podem estar associados com a origem do CCE (TORRES-PEREIRA, 2010). Algumas desordens apresentam potencial de malignidade para o desenvolvimento do câncer bucal. Dentre elas destacam as leucoplasias, eritroleucoplasias, fibrose submucosa oral, líquen plano e queilite actínica (VAN DER WAAL, 2009).

Estudo aponta o aspecto sociodemográfico como um fato contribuinte para o aumento da prevalência de câncer de cabeça e pescoço. Grupos sociais com maior índice de pobreza apresentam maior prevalência e maior número de casos com diagnósticos tardios de carcinomas. A dificuldade ao acesso aos serviços de saúde e ausência de programas de prevenção está relacionada ao maior numero de casos que afetam tanto o tratamento como o prognóstico dos pacientes, acarretando entre outras coisas, maiores custos para o tratamento (REREDDY *et al.*, 2015).

### 3.4 Câncer de Mama

Estima-se que 21,4 milhões de novos casos de câncer no ano de 2030 e 13,2 milhões de mortes por doença no mundo, devido ao crescimento e envelhecimento da população. (INCA, 2014). No Brasil, estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) registraram 596 mil

casos de câncer em 2016/2017, com 295.200 casos esperados entre homens e 300.800 casos entre mulheres (INCA, 2015).

O câncer de mama (CM) é considerado a neoplasia mais comum que afeta as mulheres e representa quase 25% de todos os casos de câncer (INCA, 2014). Essa neoplasia foi considerada mundialmente a quinta causa de morte por câncer em 2012, com 522 mil casos sendo a principal causa de morte por câncer em regiões subdesenvolvidas (14,3% do total) e a segunda causa de morte por câncer nas regiões subdesenvolvida (15,4% do total) (WHO, 2012). Nos Estados Unidos, aproximadamente 246.660 novos casos e 40.450 óbitos por câncer de mama foram estimados em 2016 (ACS, 2015).

No Brasil, a cada oito mulheres (12%), uma desenvolverá CM ao longo da vida. Com exceção da região norte, o CM será o mais prevalente entre as mulheres (INCA, 2015). Em relação aos dados globais, o Brasil tem uma maior taxa de mortalidade por CM. Uma proporção de 13,6 em comparação com 12,7 por 100 mil mulheres no resto do mundo. A estimativa para o ano de 2016 foi de 57.960 novos casos, que representaram uma taxa de incidência de 56,2 casos por 100.000 mulheres e 59.700 casos estimados para 2018 (INCA, 2018).

O aumento da incidência e mortalidade do CM ocorreu principalmente devido ao diagnóstico tardio e ao atraso na realização da terapia adequada, o que reduz as chances de cura, que está diretamente relacionado ao diagnóstico precoce da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Portanto, estudos sobre CM são relevantes, uma vez que é um dos cânceres mais frequentes entre as mulheres, tanto no Brasil como no mundo (SCHNEIDER *et al.*, 2014).

### 3.5 Fissuras de lábio e/ou palato não sindrômicas e câncer

Tem sido demonstrado que avaliar as FL/PNS apenas sob o aspecto da malformação craniofacial é uma estimativa aquém das reais consequências dessa condição. Os indivíduos afetados apresentam menor vida útil, com risco aumentado para todas as causas principais de morte, quando comparado com indivíduos que não são afetados (CHRISTENSEN *et al.*, 2004).

Para o indivíduo afetado, há ainda significativa morbidade ao longo da vida uma vez que efeitos sobre a fala, audição, aparência e cognição geram resultados adversos sobre a saúde e integração social (MOSSEY *et al.*, 2009). Um dos possíveis fatores relacionados a um menor tempo de vida nesses pacientes tem sido a associação entre FL/PNS e câncer (NAROD *et al.*, 1997; NISHI *et al.*, 2000).

O câncer e malformações congênitas tais como fissura lábio/palatina podem ocasionalmente ter uma etiologia comum. Isso se deve porque os genes envolvidos nos dois processos podem ter funções associadas durante o desenvolvimento normal da face, bem como no desenvolvimento do câncer (NISHI *et al.*, 2000; ZHU *et al.*, 2002; BILLE *et al.*, 2005; MENEZES *et al.*, 2009).

Bui *et al.* (2018) avaliaram quantitativamente a associação entre história familiar de câncer e desenvolvimento de fissuras lábio palatina e evidenciaram uma relação significativa entre elas. Em face das possíveis relações etiológicas entre estas duas importantes condições de saúde pública, câncer e FL/PNS, vêm surgindo em diversas regiões mundiais análises sobre esta possível correlação (MENEZES *et al.*, 2009; TAIOLI *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2012).

Menezes *et al.* (2009) avaliaram 75 famílias com FL/PNS e 93 controles sem histórico de câncer. Foi observado nesse estudo história familiar de câncer mais frequente em familiares de pacientes com FL/PNS comparado a indivíduos controle, destacando-se os cânceres de cólon, cérebro, leucemia, mama, próstata, pele, pulmão e fígado. Estudo realizado por Bille *et al.* (2005) apontou que indivíduos adultos com FL/P apresentam risco aumentado para ocorrência de câncer de mama em mulheres. Embora não haja outros trabalhos corroborando com a associação especificamente entre câncer de mama e FL/PNS, os trabalhos prévios envolvendo câncer em geral e FL/P tem indicado uma provável via em comum entre essas duas condições. Dessa forma, tem sido sugerido que as neoplasias malignas e FL/P possuem variações em comum nos genes que regulam o crescimento e desenvolvimento tecidual (NAROD *et al.*, 1997; NISHI *et al.*, 2000; TAIOLI *et al.*, 2010). Alguns genes já discutidos com relação a esta associação são a via de sinalização de fibroblastos (*FGF*), caderina epitelial (*CDH1*) e eixo de inibição da proteína 2 (*AXIN2*) (LETRA *et al.*, 2012).

Outros genes associados ao câncer e fissura são aqueles que compõem a via de sinalização WNT, cada um com uma função específica na complexa cascata de eventos que conduzem à

morfogênese normal da face (MANI *et al.*, 2010). Dessa via WNT participam os genes *GSK3B* (glycogen synthase kinase-b), *Dsh* (Dishevelled), *APC* (adenomatous polyposis coli) e *AXIN*. Genes WNT foram recentemente sugeridos como genes candidatos à FL/P, devido às suas funções essenciais durante o desenvolvimento embrionário (CHIQUET *et al.*, 2008). Mutações em *AXIN2* também foram detectadas em famílias segregando câncer e agenesia dentária (LAMMI *et al.*, 2004). Polimorfismos em *AXIN2* foram associadas à FL/P em um estudo caso-controle (LETRA *et al.*, 2009) e em um estudo de base familiar em que a incidência de câncer em famílias com fissura foi notavelmente maior do que em famílias do grupo controle (MENEZES *et al.*, 2009).

Vários genes compõe a via de sinalização WNT, cada um com um papel específico de contribuição na complexa cascata de eventos responsáveis na morfogênese normal da face (MANI *et al.*, 2010). Dessa via WNT participam os genes *GSK3B* (*glycogen synthase kinase-b*), *Dsh* (Dishevelled), *APC* (*adenomatous polyposis coli*) e *AXIN*. Genes WNT foram sugeridos como genes candidatos à FL/P, devido às suas funções essenciais durante o desenvolvimento embrionário (CHIQUET *et al.*, 2008). *WNT3A* indiretamente pode regular o nível de fosforilação no receptor *LRP6* (*LDL receptor related protein 6*) e iniciar a via de sinalização *WNT/b-catenina* (PAN *et al.*, 2008). Estudos com camundongos mostraram controlar o destino de ambas as células mesenquimais e células da crista neural nos processos craniofaciais e regular fusão do palato (YAMAGUCHI *et al.*, 1999). Variantes polimórficas também foram identificadas em *WNT3A* no desenvolvimento do CCE (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2011). *GSK3B* desempenha um papel importante no desenvolvimento e homeostase epitelial (KIM *et al.*, 2007). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em *GSK3B* tem sido associado ao CCE (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2011).

Além disso, mutações no *AXIN2*, um gene pertencente à via de sinalização WNT, tem sido detectado em grupos familiares segregando câncer e agenesia dentária (LAMMI *et al.*, 2004). Os polimorfismos (SNPs) em *AXIN2* foram associados à fissura lábio/palatina em um estudo caso-controle (LETRA *et al.*, 2009) e em um estudo familiar onde a incidência de câncer em famílias fendidas foi notavelmente maior que nas famílias de controle (MENEZES *et al.*, 2009).

Estudo de polimorfismos nos genes *AXIN2* e *CDH1* associados ao câncer de mama e gástrico com risco para FL/PNS em uma população brasileira demonstrou uma relevância clínica. Os

resultados sugeriram que o polimorfismo rs7210356 (*AXIN2*) está associado à ocorrência de FL/PNS na população investigada (MACHADO *et al.*, 2017). Este mesmo polimorfismo foi associado ao risco de câncer de mama em mulheres em pré-menopausa (WANG *et al.*, 2008).

Andrade-Filho *et al.* (2011) verificando a expressão de mRNA dos genes *WNT3A*, *GSK3B* e *AXIN1*, constataram que a expressão desses genes foi significativamente maior no grupo caso com carcinoma oral de células escamosas em comparação com o grupo controle ( $p < 0,001$ ), enquanto a expressão do mRNA nos genes *AXIN2* e *WNT11* foi semelhante em ambos os grupos, com *WNT11* mostrando expressão ainda menor nos tecidos tumorais.

A importância da sinalização WNT para o desenvolvimento craniofacial adequado em embrião de ratos foi relatada por vários autores (JURILOFF *et al.*, 2005; LAN *et al.*, 2006). A ativação da sinalização WNT também foi demonstrada como a etiologia subjacente de alguns tipos de câncer bucal (LIU e MILLAR, 2010). Evidências crescentes também existem para apoiar a hipótese de que alguns genes exibem funções essenciais durante a embriogênese e, em algum momento, podem estar envolvidos no desenvolvimento do câncer (CHRISTENSEN *et al.*, 2004; BILLE *et al.*, 2005; MENEZES *et al.*, 2009). Estudos mostraram a associação de polimorfismos dos genes *GSK3B* e *WNT11* com carcinoma de células escamosas oral, fortalecendo evidências de que as variações nos genes WNT demonstraram estar envolvidas durante o processo de desenvolvimento oral-facial além de poder aumentar a susceptibilidade de um indivíduo de desenvolver carcinoma de células escamosas orais (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2011).

As variações nos genes da via WNT foram associadas a fissuras orofaciais não-sindrômicas em diferentes populações, além de apoiar que os genes da via WNT podem estar envolvidos na etiologia das fissuras orais em seres humanos também (CHIQUET *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2010). Estudos adicionais em camundongos e humanos suportam o envolvimento de genes da via WNT na etiologia das fissuras faciais. Utilizando uma linhagem de ratos A/WySn consanguíneo caracterizada pela presença de palato fendido, os genes *WNT3* e *WNT9B* foram encontrados nos polimorfismos associados a fissuras lábio/palatina, sugerindo seu possível envolvimento no fenótipo da fenda (JURILOFF *et al.*, 2005).

O polimorfismo no gene *GSK3B* que também faz parte da via de sinalização de WNT e desempenha um papel importante na homeostase de células epiteliais, interage com muitas

vias diferentes (KIM *et al.*, 2007). Embora suas funções específicas de desenvolvimento permaneçam obscuras, uma associação significativa do polimorfismo em *GSK3B* (rs9879992) foi associada com carcinoma de células escamosas orais (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2011). Estudo similar observou a associação do *GSK3B* altamente expresso em biópsias de carcinoma de células escamosas orais que propôs que a manipulação do *GSK3B* ativado possa proporcionar esperança para o tratamento do câncer bucal (MISHRA, 2010).

O papel do *GSK3B* em defeitos craniofaciais também foi demonstrado em camundongos com palato fendido, fusão incompleta das costelas na linha média e esterno bífido e ossificação do esterno retardada (LIU *et al.*, 2007). Variação nos genes da via WNT, em particular *GSK3B*, pode contribuir para a susceptibilidade de um indivíduo ao CCE (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2011).

A expressão gênica nos tecidos tumorais podem apresentar correlações positivas quando há associação com FL/PNS nos e genes da via WNT. A associação dos genes *WNT3A*, *GSK3B* e *AXIN1*, por exemplo, foram significativamente reguladores nos casos de CCE em comparação com o grupo controle, enquanto o *AXIN2* foi ligeiramente regulador. Contudo o *WNT11*, quando associado, foi subexpresso. Além disso, observou correlações positivas para *GSK3B* com *WNT3A*, *AXIN1* e *AXIN2*, onde *GSK3B* e *WNT3A* são considerados "causadores de tumor", e *AXIN1* e *AXIN2* são considerados "resistentes ao tumor". Concluindo a importância de estudar vias genéticas em vez de um único gene como causador de doenças complexas como câncer e anomalias craniofaciais (ANDRADE-FILHO *et al.*, 2011).

O aumento de ocorrência de malformações, erros leves de morfogênese e câncer têm sido encontrados em uma série de casos, sugerindo uma etiologia comum (BILLE *et al.*, 2005). Andrade-Filho *et al.* (2011) sugeriram genes importantes no desenvolvimento do lábio e palato como causa do CCE de boca. Embora não haja outros trabalhos corroborando com a associação especificamente entre carcinoma de células escamosas e FL/PNS, os trabalhos prévios envolvendo câncer em geral e FL/P tem indicado uma provável via em comum entre essas duas condições (LETRA *et al.*, 2009; KÜCHLER *et al.*, 2014; SABÓIA *et al.*, 2015). Dessa forma, tem sido sugerido que as neoplasias malignas e FL/PNS possuem variações em comum nos genes que regulam o crescimento e desenvolvimento tecidual (NAROD *et al.*, 1997; NISHI *et al.*, 2000; TAIOLI *et al.*, 2010). Alguns genes já discutidos com relação a esta associação são *IRF6*, a via de sinalização WNT e a região 8q24 (ANDRADE-FILHO *et al.*,

2011; PENG *et al.*, 2011; MELATH *et al.*, 2013). Estudo *in vivo* demonstrou também sua importância no desenvolvimento ósseo e na formação do palato (LIU *et al.*, 2007). Outro gene na via WNT, o *WNT11* também mostra envolvimento no desenvolvimento craniofacial e no CCE (MENEZES *et al.*, 2009; ANDRADE-FILHO *et al.*, 2011; VINCENT-CHONG *et al.*, 2012). O papel de *WNT11* se relaciona com os movimentos direcionais das células através da regulação da adesão celular em conexão com mudanças no citoesqueleto (NAGY *et al.*, 2010). Alterações neste gene também estão relacionadas ao desenvolvimento de diastemas dentários (PORNTAVEETUS *et al.*, 2012).

O *locus* 8q24 tem demonstrado papel importante em vários estudos relacionados à FL/PNS em diferentes populações. Mangold *et al.* (2010) demonstraram que uma região abrangendo 640 Kb nesta região cromossômica contém possivelmente múltiplos marcadores associados à FL/PNS, contudo, como em GWAS os pesquisadores têm que determinar um *threshold* alto para separar de forma confiável os marcadores verdadeiros de falso-positivos, apenas o marcador rs987525 se sobressaiu. A associação entre rs987525 e FL/PNS desde então tem sido replicada em estudos adicionais em pacientes de várias etnias (MOSTOWSKA *et al.*, 2010; ROJAS-MARTINEZ *et al.*, 2010). Alterações na região 8q24 também são descritas em vários estudos GWAS como causa em câncer de próstata, de mama, cólon, ovário, bexiga e leucemia linfocítica crônica (GUDMUNDSSON *et al.*, 2007; EASTON *et al.*, 2007; YEAGER *et al.*, 2007; ZANKE *et al.*, 2007; GROUSSAINI *et al.*, 2008; EELES *et al.*, 2008; TOMLINSON *et al.*, 2008; CROWTHER *et al.*, 2010).

Notavelmente, um dos genes mais acometidos na região 8q24 é o *MYC*. A proximidade das variantes polimórficas do proto-oncogene *MYC* e sua longa história na biologia do câncer, faz com que este gene seja particularmente um candidato importante para a condução da carcinogênese (GRISANZIO e FREEDMAN, 2010). Entretanto, análise em uma população brasileira para outros *locus* revelou uma significância na interação dos polimorfismos rs7552 (2q24.2), rs1880646, rs7406226, rs9891446 (17p13) e rs73039426 (19q13.11) associado a FL/PNS (MACHADO *et al.*, 2018a).

Estudos com CCE mostram o gene *MYC* como provável causa do seu desenvolvimento (LEE *et al.*, 2014). Adicionalmente, Brito *et al.* (2012) relataram que *MYC* apresenta importância no controle da proliferação celular. A ausência de outros genes conhecidos dentro da região 8q24

no desempenho no desenvolvimento craniofacial faz com que o polimorfismo rs987525 localizado em *MYC* seja importante para melhor entender a associação entre FL/PNS e CCE.

Uma segunda região estudada tanto em CM como FL/PNS é o polimorfismo rs1695 localizado no gene *GSTP1* (*glutathione-S transferase*) (RAMIREZ *et al.*, 2007; DUGGAN *et al.*, 2013). A proteína *GSTP1* é altamente expressa no início da vida fetal e parece estar envolvida na desintoxicação de constituintes do tabaco (RAMIREZ *et al.*, 2007). É provável que essa variante em *GSTP1* altere a sua atividade enzimática. Esse polimorfismo foi associado a CM em um estudo conduzido por Duggan *et al.* (2013), no qual revelaram que o alelo variante do polimorfismo rs1695 parece estar associado a um maior risco de mortalidade em CM. Uma associação positiva não foi confirmada no estudo envolvendo FL/PNS.

No CM, estudo conduzido por Wang *et al.* (2008) mostraram que cinco polimorfismos em *AXIN2* foram associados a um risco aumentado para essa neoplasia. Essa associação entre CM e *AXIN2* também foi sugerida por Alanazi *et al.* (2013). Uma associação de câncer de mama com os polimorfismos rs7224837 e rs3923086 do gene *AXIN2* em FL/PNS foi demonstrada na palatogênese em animais e os autores observaram uma co-localização da proteína *AXIN2* e *IRF6* no epitélio palatino, bem como demonstraram uma interação alélica entre polimorfismos em *AXIN2* e *IRF6*, suportando o papel de *AXIN2* em FL/PNS (LETRA *et al.*, 2012).

Uma revisão sistemática para descrever informações sobre marcadores de risco genéticos para susceptibilidade a fissuras orais não sindrômicas em populações brasileiras demonstrou que os marcadores de risco clássicos localizados no gene *IRF6* e no locus 8q24 foram associados com risco aumentado para FL/PNS (MACHADO *et al.*, 2018b). O gene *IRF6* é um dos genes mais consistentes nos estudos em FL/PNS, em particular os polimorfismos rs2235371 e rs642961. Beaty *et al.* (2016) demonstraram que o *IRF6* e 8q24 foram validados em vários populações nos estudos envolvendo FL/PNS. A associação de variantes no gene *IRF6* com FL/PNS também foi replicada em outras populações recentemente (TOMITA *et al.*, 2018).

O polimorfismo rs2235371 (820G>A) substitui uma valina por uma isoleucina na posição do aminoácido 274 (V274I) no domínio de ligação de *IRF6* (JUGESSUR *et al.*, 2008). O polimorfismo rs642961 (G>A) altera o sítio de ligação do fator de transcrição AP2-alfa na região promotora do *IRF6* (ZUCCHERO *et al.*, 2004). Além do papel clássico em fissuras, tendo em vista a associação com FL/PNS, bem como o papel determinante desse gene na



síndrome de *Van der Woude*, que apresenta fissura no seu espectro clínico (KONDO *et al.*, 2002; JUGESSUR *et al.*, 2008; MARAZITA *et al.*, 2009), *IRF6* também é apontado em associação a estudos em glândula mamária. Um estudo mostrou uma interação proteína-proteína entre *IRF6* e Maspin (Protease do grupo serina supressora de tumor) (BAILEY *et al.*, 2005). Maspin é um supressor de tumor expresso no tecido mamário normal que desempenha um papel importante durante o desenvolvimento da glândula mamária. Em um segundo trabalho, Bailey *et al.* (2008) mostraram que *IRF6* possui funções sinérgicas com Maspin na diferenciação de células epiteliais mamárias, agindo sobre o ciclo celular e consequentemente durante a iniciação e progressão do câncer de mama.

Alguns polimorfismos descritos para FL/PNS são independentemente associados também a CM. Dentre eles, destacam-se os polimorfismos rs1801133 (*C677T*) e rs1801131 (*A1298C*) no gene *MTHFR* (5,10-met-ylenetetrahydrofolate redutase) (VIEIRA *et al.*, 2008; YU e CHEN *et al.*, 2012; LIANG *et al.*, 2014). Esse gene codifica uma enzima crítica para a homeostase e o metabolismo do folato intracelular. Derivados do ácido fólico são doadores universais de unidades de carbono e são essenciais para a síntese de ácidos nucléicos e na metilação do DNA (MORRISON *et al.*, 1998). Estudos indicam que os polimorfismos *C677T* e *A1298C* do gene *MTHFR* são envolvidos na etiologia do câncer de mama entre a população chinesa (LIANG *et al.*, 2014) e são associados a FL/PNS em algumas populações (LUO *et al.*, 2012; BUTALI *et al.*, 2013). O polimorfismo rs1801133 resulta na substituição de uma alanina por uma valina na posição 222, causando uma redução na atividade da enzima expressa por esse gene, o que gera baixos níveis plasmáticos de folato. Adicionalmente a esses dois polimorfismos clássicos, um estudo na população brasileira identificou o polimorfismo rs2274976 no gene *MTHFR* em associação às FL/PNS. A variante desse polimorfismo nas mães de indivíduos com FL/PNS mostrou um risco aumentado em 6 vezes de ter um filho com FL/PNS. Em adição, o risco foi elevado para 8,34 vezes em mães que apresentaram o genótipo GA do polimorfismo rs2274976 e não fizeram uso de suplementos vitamínicos no primeiro trimestre de gestação (BUFALINO *et al.*, 2010).

Uma segunda região estudada tanto em CM como FL/PNS é o polimorfismo rs1695 localizado no gene *GSTP1* (RAMIREZ *et al.*, 2007; DUGGAN *et al.*, 2013). A proteína GSTs (glutathione-S transferase) codificada pelo gene *GSTP1* é altamente expressa no início da vida fetal e parece estar envolvida na desintoxicação de constituintes do tabaco (RAMIREZ *et al.*, 2007). É provável que essa variante em *GSTP1* altere a sua atividade enzimática. Esse

polimorfismo foi associado a câncer de mama em um estudo conduzido por Duggan *et al.* (2013), no qual revelaram que o polimorfismo rs1695 parece estar associado a um maior risco de mortalidade em CM. Uma associação positiva não foi confirmada no estudo envolvendo FL/PNS (DUGGAN *et al.*, 2013).

Este estudo analisou polimorfismos contidos nos genes *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3B*, *WNT1* e no *locus* 8q24 associados à fissura oral como possíveis marcadores de susceptibilidade ao câncer de mama e carcinoma de células escamosas de cavidade bucal em uma população brasileira.

## 4 MÉTODOLOGIA

### 4.1 Amostras

Realizou-se um estudo caso-controle em que foram incluídas amostras para duas condições diferentes. A primeira condição foi constituída de 79 pacientes com carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) para o grupo caso com as amostras provenientes do hospital da Santa Casa de Montes Claros (MG, Brasil) e da Liga Contra o Câncer, Natal (RN, Brasil). O grupo controle (CCEB- Controle) constou de 130 indivíduos com as amostras coletadas em indivíduos saudáveis que aceitaram participar da pesquisa, os quais foram requisitados em clínicas de odontologia. A segunda condição incluiu 159 pacientes com câncer de mama (CM) provenientes do hospital da Santa Casa de Montes Claros (MG, Brasil). O grupo controle (CM - Controle) foi composto por 121 mulheres saudáveis que aceitaram participar da pesquisa.

Os casos de CCEB ou CM foram confirmados histologicamente. Os dados sobre, quimioterápicos, medicação, tabagismo e o consumo de álcool foram coletados para os participantes de todos os grupos relacionados. Os grupos controles de ambas as condições foram compostos de indivíduos saudáveis sem doença física, psiquiátrica, câncer, defeitos congênitos ou com história familiar de fissuras orofaciais. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética de cada um dos hospitais afiliados ao estudo colaborativo. Os números dos processos do parecer do comitê de ética para o estudo com pacientes com câncer de boca foram: 022/022/2014 da Liga Contra o Câncer, Natal (RN, Brasil) e 3247/2011 na Santa Casa de Montes Claros (MG, Brasil). E para o estudo com pacientes com câncer de mama, o número do processo foi 1145493/2015.

### 4.2 Seleção dos SNPs

Foram selecionados 5 SNPs em genes que foram previamente sugeridos como genes candidatos para fissuras labiais não sindrômico com ou sem palato (FL/PNS) com base em estudos de associação em diferentes populações ou em modelos animais (GUDMUNDSSON *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007; CHIQUET *et al.*, 2008; BIRNBAUM *et al.*, 2009; GRANT *et*

*al.*, 2009; CROWTHER-SWANEOEL *et al.*, 2010) para testar a associação com CCEB e CM em uma população brasileira. Os detalhes dos SNPs selecionados e dos genes investigados são apresentados no quadro 1.

Quadro 1. Características dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs).

SNP	Gene	Chromosome	Position	Function	Alleles	MAF
rs642961	<i>IRF6</i>	1	209,815,925	Promoter	G/a	0.177
rs708111	<i>WNT3A</i>	1	228,003,664	Promoter	T/c	0.485
rs9879992	<i>GSK3B</i>	3	119,993,874	Intron	A/g	0.273
rs987525	8q24	8	128,933,908	Intergenic	C/a	0.288
rs1533767	<i>WNT11</i>	11	76,194,756	Exon	G/a	0.223

MAF: Frequência do alelo menor. Alelo menor em minúsculas.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

### 4.3 Genotipagem

O DNA genômico dos pacientes com CCEB foi isolado de células do sangue periférico (AIDAR e LINE, 2007). Em essência, o sangue fresco foi ressuspensão em três volumes de tampão RBC (10 mM de KHCO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, EDTA 0,1 mM), centrifugado e o sedimento de células foi ressuspensão em tampão de lise (Tris 10 mM pH 8,0, SDS a 0,5% e EDTA 5 mM) contendo 0,2 µg / µl de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após a incubação durante 3 h a 50°C, as proteínas foram removidas por precipitação com acetato de amônio e EDTA.

Para os pacientes com CM, CM - Controle e CCEB – Controle, o DNA genômico foi extraído de células de mucosa oral obtidas por bochecho com uma solução de sacarose a 3% usando o mesmo protocolo descrito acima. A genotipagem baseada em PCR foi realizada na plataforma StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando TaqMan 5'-exonuclease com ensaios de discriminação alélica (Assay-on Demand, Applied Biosystems).

#### 4.4 Análise estatística

Todos os SNP genotipados foram testados para o HWE usando o teste  $\chi^2$ . Os significados estatísticos para frequências de genótipos entre pacientes com CCEB e CCEB - Controle foram ajustados para variáveis cofundidoras (idade, sexo, tabagismo) por análise de regressão logística usando o pacote R SNPAssoc (GONZÁLEZ *et al.*, 2007). Além disso, implantamos o SNPAssoc do pacote R para comparar os pacientes CM e os indivíduos CM - Controle relacionados às frequências de genótipos do polimorfismo. Para análise da interação gene-gene, utilizamos o pacote R mbmdr (CALLE *et al.*, 2010). A força das associações entre as variações genéticas de *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3B*, 8q24 e *WNT11* foi estimada com odds ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC). O teste múltiplo foi corrigido executando 1.000 permutações aleatórias e o valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5 PRODUTO

5.1 Artigo Científico: *Polymorphisms associated with oral clefts as potential susceptibility markers for oral and breast cancer.*

Periódico submetido: Archives of oral Biology.

## 5.1 Artigo Científico

### **Polymorphisms associated with oral clefts as potential susceptibility markers for oral and breast cancer**

Edimilson Martins de Freitas<sup>1</sup>, Renato Assis Machado<sup>2,\*</sup>, Edilmar de Moura Santos<sup>3</sup>, Felipe Rodrigues de Matos<sup>4</sup>, Hébel Cavalcanti Galvão<sup>3</sup>, Priscila Bernardina Miranda Soares<sup>5</sup>, Roseana de Almeida Freitas<sup>3</sup>, Hercílio Martelli-Júnior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Stomatology Clinic, Dental School, State University of Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

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

<sup>3</sup>Department of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

<sup>4</sup>Department of Dentistry, Federal University of Sergipe, Lagarto, Sergipe, Brazil

<sup>5</sup>Oncovida Hospital, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

\*Correspondence to:

Renato Assis Machado, Department of Oral Diagnosis, Dental School, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Email: renatoassismachado@yahoo.com.br

### **Highlights**

- The G allele at rs9879992 in *GSK3β* was a risk factor for oral cancer (p=0.02).

- The A allele of rs1533767 (*WNT11*) showed a protective effect for oral cancer ( $p=0.04$ ).
- Several SNP-SNP interactions were significantly associated with oral cancer risk, but only those containing *GSK3 $\beta$*  rs9879992 withstood 1,000 permutation test.
- SNP-SNP interactions involving all 5 SNPs with the risk of breast cancer were found, but the most significant interaction involved rs1533767 (*WNT11*), rs708111 (*WNT3A*), rs642961 (*IRF6*) and rs9879992 (*GSK3 $\beta$* ) ( $p<0.001$  and  $p_{1,000\text{permutation}}<0.001$ ).



## ABSTRACT

*Objective:* To evaluate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes/loci consistently altered in nonsyndromic oral clefts in patients with oral and breast cancer in a Brazilian population.

*Design:* This case-control study evaluated the association of SNPs in *IRF6* (rs642961), *WNT3A* (rs708111), *GSK3 $\beta$*  (rs9879992), 8q24 (rs987525) and *WNT11* (rs1533767), representing regions consistently identified as of susceptibility for oral clefts, with oral cancer (oral squamous cell carcinoma) and breast cancer. Logistic regression analyses were used for confounding adjustments, and  $p$  value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

*Results:* The minor G allele of rs9879992 in *GSK3 $\beta$*  was significantly associated with oral cancer risk ( $p=0.02$ ), whereas rs1533767 in *WNT11* showed a protective effect against it ( $p=0.04$ ). Several SNP-SNP interactions containing *GSK3 $\beta$*  rs9879992 were significantly associated with oral cancer after 1,000 permutation test. To breast cancer, though none individual SNP was associated, SNP-SNP interactions involving the 5 SNPs were significantly observed, with the most significant interaction among rs708111, rs1533767, rs9879992 and rs642961 ( $p_{1000\text{permutation}} < 0.001$ ).

*Conclusion:* Our results reveal associations of SNPs consistently altered in oral cleft with oral and breast cancer risk, raising interesting possibilities to identify risk markers for those tumors.

### *Keywords:*

Oral cleft, Oral cancer, Breast cancer, *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3 $\beta$* , 8q24, *WNT11*.

## 1. Introduction

Cancer is a major public health problem in the world. It is currently the second leading cause of death, and approximately 14 million new cancer cases worldwide were reported in 2012 (Ferlay et al., 2015). The carcinogenesis process is complex and involves interactions among environmental exposures, genetic factors and epigenetic alterations (Skinner, Manikkam, & Guerrero-Bosagna, 2010; Basu, 2018). Given the complex heterogeneity and pathogenicity of cancer, all these risk factors appear to be reciprocal and thus required in scrutiny of disease (Ferlay et al., 2015). In the Brazil, the most incident cancers are prostate, lung, colon and rectum, stomach and oral cavity among males, and for females, the top are breast, colon and rectum, cervix and lung, respectively, with the exception of non-melanoma skin cancer (INCA, 2018).

Previous studies have showed a high incidence of nonsyndromic oral clefts (NOC) in families with history of multiple cancers, and the reciprocity is also true, an increased incidence of cancer is observed in patients with NOC and their relatives (Zhu et al., 2002; Taioli et al., 2010; Jindal & Vieira, 2012; Vieira, Khaliq, & Lace, 2012; Gonçalves et al., 2014). This association is explained because specific cancers, including oral and breast cancer, and NOC may share similar genetic etiology (Menezes et al., 2009; Andrade Filho et al., 2011; Ratovitski, 2011; Machado et al., 2017). Although a number of genes and genetic loci, candidate to confer susceptibility to NOC, have been associated with cancer risk (Frebourg et al., 2006; Andrade Filho et al., 2011; Li et al., 2015), genetic studies have only provided proxies for the true functional risk variants, which are yet to be identified.

Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene encodes a transcription factor that has an emerging role in both orofacial development and cancer (Dixon et al., 2011; Melath et al., 2013; Machado et al., 2018). While *IRF6* polymorphisms, particularly rs642961, a functional

variant in an *IRF6* AP-2 $\alpha$  binding site in the promoter region, have been associated with NOC in different populations (Wang et al., 2012; Wattanawong et al., 2016; Machado et al., 2018), the loss of expression of *IRF6* due to epigenetic modifications or specific mutations are observed in both oral cancer (Melath et al., 2013) and breast cancer (Bailey et al., 2005; Zengin et al., 2015). The locus at 8q24 is another region involved in both NOC and cancer (Ahmadiyeh et al., 2010; Uslu et al., 2014). This intergenic locus contains cis-acting enhancers that control Myc expression during the development of face (Uslu et al., 2014), and multiple genetic variants in 8q24, which are significantly associated with an increased susceptibility to prostate, colorectal and breast cancer, were predicted to alter enhancer elements that physically interact with *MYC* promoter (Pomerantz et al., 2009a,b; Ahmadiyeh et al., 2010; Sotelo et al., 2010). Furthermore, oral potentially malignant disorders and oral cancer with gain on *MYC* expression showed alterations at 8q24 (Garnis et al., 2004). The Wingless/integrase (WNT) signaling pathway controls cell migration, polarity and fate during embryonic development and is widely implicated in human diseases (Clevers & Nusse, 2012). Deregulated expression of several WNT-family members has been demonstrated in cancers and NOC, and among them, *WNT3A*, *GSK3 $\beta$*  and *WNT11* have accumulated robust evidences (Kato, 2005; Mani et al., 2010; Chiquet et al., 2008; Andrade Filho et al., 2011).

In this study, we postulated that SNPs in genes associated with NOC might be related to risk for oral and breast cancer. Thus, we evaluated 5 SNPs contained in *IRF6* (rs642961), *WNT3A* (rs708111), *GSK3 $\beta$*  (rs9879992), 8q24 (rs987525) and *WNT11* (rs1533767) as possible markers of susceptibility to oral and breast cancer in a Brazilian population.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Samples*

This study included a group of patients with oral cancer (n=74) and its correspondent control group (oral cancer-control, n=130) and a group of patients with breast cancer (n=159) and its correspondent control (breast cancer-control, n=121). All cases and controls were recruited from two hospitals: a located in the southeastern region of Brazil (Santa Casa de Montes Claros, Montes Claros - Minas Gerais, State) and a located in the northeastern region of Brazil (Liga Contra o Câncer, Natal - Rio Grande do Norte, State).

The tumors were histologically confirmed. To oral cancer, only cases of oral squamous cell carcinoma were included and the information on smoking and alcohol consumption were available for the all participants. Localization, TNM clinical staging, and type of treatment were obtained from medical records of patients with oral and breast cancer (Supplementary Tables 1 and 2). Control groups were composed of healthy individuals with no physical illness, psychiatric, cancer, birth defects or with a family history of orofacial clefts. Oral cancer-control group was formed by males and females (Supplementary Table 3), whereas breast cancer-control group was composed only by females. The study was approved by the ethics review board (approval number 1.145.493 at 07/10/2015) and followed the principles stated in the Declaration of Helsinki.

## 2.2. Genotyping

Genomic DNA of patients with oral cancer was isolated from peripheral blood cells, and DNA from patients with breast cancer and control groups was extracted from oral mucosa cells obtained by mouthwash with a 3% sucrose solution (Aidar & Line, 2007). The SNPs rs642961 in *IRF6*, rs708111 in *WNT3A*, rs9879992 in *GSK3 $\beta$* , rs987525 in 8q24 and rs1533767 in *WNT11* were genotyped in the StepOnePlus Real-Time PCR platform (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using TaqMan 5'-exonuclease allelic discrimination assays (Assay-on Demand service, Applied Biosystems). Details of the selected SNPs and

genes are presented in Table 1. For quality control purposes, reactions were randomly repeated in 10% of the samples for each SNP, and the concordance rate was 100%. All samples were successfully genotyped, with a genotype call rate of 100%.

### 2.3. Statistical analysis

Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in the control groups was assessed through the chi-squared test. To assess the differences between groups, logistic regression analyses, adjusted to age, gender, smoking and alcohol consumption for oral cancer and age for breast cancer, were performed with using R-SNPassoc package (González et al., 2007). SNP-SNP interaction, analyses were performed in mbmdr (*model-based multifactor dimensionality reduction*) package incorporated to R software (Calle et al., 2010), and 1,000 permutation test was applied to verify for false-positive interactions. The p value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

Our results showed association between the minor G allele of rs9879992 in *GSK3 $\beta$*  and oral cancer risk (OR: 1.67, 95% CI: 1.07-2.59,  $p=0.02$ ) (Table 2). The A allele of rs1533767 (*WNT11*) was significantly associated with a decreased risk for oral cancer (OR: 0.62, 95% CI: 0.40-0.98,  $p$  value=0.04) (Table 2). Several SNP-SNP interactions reached significance, but only those containing *GSK3 $\beta$*  rs9879992 withstood 1,000 permutation test (Table 3).

Although none SNP was individually associated with breast cancer (Table 4), we found significant SNP-SNP interactions involving all 5 SNPs with the risk of breast cancer (Table 5). The most significant interaction involved rs1533767 (*WNT11*), rs708111 (*WNT3A*), rs642961 (*IRF6*) and rs9879992 (*GSK3 $\beta$* ) ( $p < 0.001$  and  $p_{1,000\text{permutation}} < 0.001$ ).

#### 4. Discussion

Cancer and NOC show complex etiology, but some studies have identified similar genetic variations in these two conditions suggesting common origin (Menezes et al., 2009; Andrade Filho et al., 2011; Ratovitski, 2011; Machado et al., 2017). In this study we investigated polymorphisms associated with NOC (*IRF6*, *WNT3A*, *GSK3 $\beta$* , 8q24 and *WNT11*) as possible markers of susceptibility to oral and breast cancers, and our findings support the association of rs9879992 in *GSK3 $\beta$*  and rs1533767 in *WNT11* with oral cancer. Furthermore, several SNP-SNP interactions among SNPs in the risk of oral and breast cancers were verified and confirmed by permutation tests.

The SNP rs642961 is located in the promoter of *IRF6* and abrogates one of four AP-2 $\alpha$  binding sites (Fakhouri et al., 2012). Although this SNP is considered an important transcriptional regulator of *IRF6* and is consistently associated with NOC in different populations (Wang et al., 2012; Wattanawong et al., 2016; Machado et al., 2018), our results do not support association individual of rs642961 on cancer risk. Similarly, the association between rs987525 (8q24) and NOC has since been replicated in patients of different ethnicities (Ludwig et al., 2012; Leslie et al., 2017; Machado et al., 2018) and 8q24 region has also been associated with several cancer types (Stadler et al., 2010; Wiemels et al., 2018), but our findings did not reveal an association between rs987525 genotypes individually and the risk for oral and breast cancer. On the other hand, significant associations of rs9879992 in *GSK3 $\beta$*  and rs1533767 in *WNT11* with oral cancer were observed. In agreement, both rs9879992 and rs1533767 were associated with oral cancer (Andrade Filho et al., 2011). Inactivation of *GSK3 $\beta$*  was reported during oral cancer progression, suggesting a role for assessing disease severity and for therapeutic intervention (Mishra, Nagini, & Rana, 2015). *WNT11* expression analysis showed significant down-regulation in the tumor tissues when

compared with healthy tissues, suggesting a role for *WNT11* as a tumor suppressor gene during the development of oral cancer (Andrade Filho et al., 2011).

Several SNP-SNP interactions containing rs9879992 (*GSK3 $\beta$* ), rs70811 (*WNT3A*) and rs1533767 (*WNT11*) were observed, suggesting a complex interrelation among these polymorphisms in the etiology of oral and breast cancer. Nevertheless, our findings associating the three *WNT* genes with *IRF6* and 8q24 in oral and breast cancer reinforce the suggested implications for this gene family in cancer. Even though statistical interaction does not automatically guarantee biological interaction, this finding is biologically plausible because these 3 SNPs are all in the same pathway. Thus, further examination are needs to better understand the biological mechanisms between these SNPs in the oral and breast cancer risk.

In summary, we showed significant associations of *GSK3 $\beta$*  and *WNT11* SNPs with oral cancer risk, as well as several SNP-SNP interactions between *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3 $\beta$* , 8q24 and *WNT11* in oral and breast cancer risk. However, the population size in our study is small and significant results need to be confirmed in larger groups with histories of NOC. Thus, the exact mechanism of SNPs in genes previously related to NOC and malignant neoplasms may be better understood.

### **Acknowledgments**

The authors thank all the study subjects and research staff who participated in this work.

### **Funding**

This work was supported by grants from Research Support Foundation of Minas Gerais – FAPEMIG, National Council for Scientific and Technological Development – CNPq, Coordination of Improvement of High Education Personnel (CAPES) and Procad/Casadinho.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Author Contributions**

HMJ designed and supervised the study. EMF, RAM, EMS, FRM, HCG, PBMS and RAF recruited participants, analyzed and interpreted the data, drafted and revised the manuscript; EMF and RAM performed laboratory experiments, analyzed and interpreted the data, assisted with drafting the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

### **References**

- Ahmadiyeh, N., Pomerantz, M.M., Grisanzio, C., Herman, P., Jia, L., Almendro, V., et al. (2010). 8q24 prostate, breast, and colon cancer risk loci show tissue-specific long-range interaction with MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(21), 9742-9746.
- Aidar, M., & Line, S.R. (2007). A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*, 18(2), 148-152.
- Andrade Filho, P.A., Letra, A., Cramer, A., Prasad, J.L., Garlet, G.P., Vieira, A.R., et al. (2011). Insights from studies with oral cleft genes suggest associations between WNT-pathway genes and risk of oral cancer. *J Dent Res*, 90(6), 740-746.
- Bailey, C.M., Khalkhali-Ellis, Z., Kondo, S., Margaryan, N.V., Seftor, R.E., Wheaton, W.W., et al. (2005). Mammary serine protease inhibitor (Maspin) binds directly to interferon regulatory factor 6: identification of a novel serpin partnership. *J Biol Chem*, 280(40), 34210-34217.



- Basu, A.K. (2018). DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int J Mol Sci*, 19(4), pii: E970.
- Calle, M.L., Urrea, V., Malats, N., & van Steen, K. (2010). mbmdr: an R package for exploring gene–gene interactions associated with binary or quantitative traits. *Bioinformatics*, 26(17), 2198-2199.
- Chiquet, B.T., Blanton, S.H., Burt, A., Ma, D., Stal, S., Mulliken, J.B., & Hecht, J.T. (2008). Variation in WNT genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mol Genet*, 17(14), 2212-2218.
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192-1205.
- Dixon, M.J., Marazita, M.L., Beaty, T.H., & Murray, J.C. (2011). Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*, 12(3), 167-178.
- Fakhouri, W.D., Rhea, L., Du, T., Sweezer, E., Morrison, H., Fitzpatrick, D., et al. (2012). MCS9.7 enhancer activity is highly, but not completely, associated with expression of Irf6 and p63. *Dev Dyn*, 241(2):340-349.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5), E359-386.
- Frebourg, T., Oliveira, C., Hochain, P., Karam, R., Manouvrier, S., Graziadio, C., et al. (2006). Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *J Med Genet*, 43(2), 138-142.
- Garnis, C., Coe, B.P., Ishkanian, A., Zhang, L., Rosin, M.P., & Lam, W.L. (2004). Novel regions of amplification on 8q distinct from the MYC locus and frequently altered in oral dysplasia and cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 39(1), 93-98.

- Gonçalves, E., Martelli, D.R., Coletta, R.D., Vieira, A.R., Caldeira, A.P., & Martelli Jr, H. (2014). Risk of leukemia in first degree relatives of patients with nonsyndromic cleft lip and palate. *Braz Oral Res*, 28(1), 1-3.
- González, J.R., Armengol, L., Solé, X., Guinó, E., Mercader, J.M., Estivill, X., & Moreno, V. (2007). SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*, 23(5), 644-645.
- INCA (Instituto Nacional de Câncer). (2018). Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp> Accessed 22 July 2018.
- Jindal, A., & Vieira, A.R. (2012). Family history of cleft lip and palate in subjects diagnosed with leukemia. *Am J Med Genet A*, 158A(3), 678-679.
- Katoh, M. (2005). WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep*, 14(6), 1583-1588.
- Leslie, E.J., Carlson, J.C., Shaffer, J.R., Butali, A., Buxó, C.J., Castilla, E.E., et al. (2017). Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic orofacial clefts identify novel associations between FOXE1 and all orofacial clefts, and TP63 and cleft lip with or without cleft palate. *Human Genetics*, 136(3), 275-286.
- Li, S., Wang, C., Liu, X., & Hua, S. (2015). The roles of AXIN2 in tumorigenesis and epigenetic regulation. *Fam Cancer*, 14(2), 325-331.
- Ludwig, K.U., Mangold, E., Herms, S., Nowak, S., Reutter, H., Paul, A., et al. (2012). Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nature Genetics*, 44(9), 968-971.
- Machado, R.A., de Freitas, E.M., de Aquino, S.N., Martelli, D.R., Swerts, M.S., Reis, S.R., et al. (2017). Clinical relevance of breast and gastric cancer-associated polymorphisms as potential susceptibility markers for oral clefts in the Brazilian population. *BMC Med Genet*, 18(1), 39.

- Machado, R.A., de Toledo, I.P., Martelli-Júnior, H., Reis, S.R., Neves Silva Guerra, E., & Coletta, R.D. (2018). Potential genetic markers for nonsyndromic oral clefts in the Brazilian population: A systematic review and meta-analysis. *Birth Defects Res*, Feb 15. (in press).
- Mani, P., Jarrell, A., Myers, J., & Atit, R. (2010). Visualizing canonical Wnt signaling during mouse craniofacial development. *Dev Dyn*, 239(1), 354-363.
- Melath, A., Santhakumar, G.K., Madhavannair, S.S., Nedumgottil, B.M., & Ramanathan, A. (2013). A novel heterozygous mutation (F252Y) in exon 7 of the IRF6 gene is associated with oral squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(11), 6803-6806.
- Menezes, R., Marazita, M.L., Goldstein McHenry, T., Cooper, M.E., Bardi, K., Brandon, C., et al. (2009). AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. *J Am Dent Assoc*, 140(1), 80-84.
- Mishra, R., Nagini, S., & Rana, A. (2015). Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. *Mol Cancer*, 14:20.
- Pomerantz, M.M., Ahmadiyah, N., Jia, L., Herman, P., Verzi, M.P., Doddapaneni, H., et al. (2009a). The 8q24 cancer risk variant rs6983267 shows long-range interaction with MYC in colorectal cancer. *Nat Genet*, 41(8), 882-884.
- Pomerantz, M.M., Beckwith, C.A., Regan, M.M., Wyman, S.K., Petrovics, G., Chen, Y., et al. (2009b). Evaluation of the 8q24 prostate cancer risk locus and MYC expression. *Cancer Res*, 69(13), 5568-5574.
- Ratovitski, E.A. (2011).  $\Delta$ Np63 $\alpha$ /IRF6 interplay activates NOS2 transcription and induces autophagy upon tobacco exposure. *Arch Biochem Biophys*, 506(2), 208-215.

- Skinner, M.K., Manikkam, M., & Guerrero-Bosagna, C. (2010). Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab*, *21*(4), 214-222.
- Sotelo, J., Esposito, D., Duhagon, M.A., Banfield, K., Mehalko, J., Liao, H., et al. (2010). Long-range enhancers on 8q24 regulate c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(7), 3001-3005.
- Stadler, Z.K., Thom, P., Robson, M.E., Weitzel, J.N., Kauff, N.D., Hurley, K.E., et al. (2010). Genome-wide association studies of cancer. *J Clin Oncol*, *28*(27), 4255-4267.
- Taioli, E., Ragin, C., Robertson, L., Linkov, F., Thurman, N.E., & Vieira, A.R. (2010). Cleft lip and palate in family members of cancer survivors. *Cancer Invest*, *28*(9), 958-962.
- Uslu, V.V., Petretich, M., Ruf, S., Langenfeld, K., Fonseca, N.A., Marioni, J.C., & Spitz, F. (2014). Long-range enhancers regulating Myc expression are required for normal facial morphogenesis. *Nature Genetics*, *46*(7), 753-758.
- Vieira, A.R., Khaliq, S., & Lace, B. (2012). Risk of cancer in relatives of children born with isolated cleft lip and palate. *Am J Med Genet A*, *158A*(6), 1503-1504.
- Wang, M., Pan, Y., Zhang, Z., & Wang, L. (2012). Three polymorphisms in IRF6 and 8q24 are associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: Evidence from 20 studies. *American Journal of Medical Genetics A*, *158A*(12), 3080-3086.
- Wattanawong, K., Rattanasiri, S., McEvoy, M., Attia, J., & Thakkestian, A. (2016). Association between IRF6 and 8q24 polymorphisms and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: Systematic review and meta-analysis. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, *106*(9), 773-788.
- Wiemels, J.L., Walsh, K.M., de Smith, A.J., Metayer, C., Gonseth, S., Hansen, H.M., et al. (2018). GWAS in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals novel genetic associations at chromosomes 17q12 and 8q24.21. *Nat Commun*, *9*(1), 286.

Zengin, T., Ekinici, B., Kucukkose, C., & Yalcin-Ozuysal, O. (2015). IRF6 Is Involved in the Regulation of Cell Proliferation and Transformation in MCF10A Cells Downstream of Notch Signaling. *PLoS ONE*, *10*(7), e0132757.

Zhu, J.L., Basso, O., Hasle, H., Winther, J.F., Olsen, J.H., & Olsen, J. (2002). Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? a nationwide study in Denmark. *Br J Cancer*, *87*(5), 524-528.

**Table 1** Characteristics of the single nucleotide polymorphisms (SNP).

SNP	Gene	Chromosome	Position	Function	Alleles	MAF
rs642961	<i>IRF6</i>	1	209,815,925	Promoter	G/a	0.177
rs708111	<i>WNT3A</i>	1	228,003,664	Promoter	T/c	0.485
rs9879992	<i>GSK3<math>\beta</math></i>	3	119,993,874	Intron	A/g	0.273
rs987525	8q24	8	128,933,908	Intergenic	C/a	0.288
rs1533767	<i>WNT11</i>	11	76,194,756	Exon	G/a	0.223

MAF: minor allele frequency. Minor allele in lower case. Source:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

**TABLE 2** Association of single nucleotide polymorphisms in patients with oral squamous cell carcinoma. *P* values were adjusted for confounders by logistic regression analysis.

	HWE <i>p</i> value	Control (%)	Case (%)	OR <sub>allele</sub> (95% CI) <i>p</i> value	OR <sub>Het</sub> (95% CI) <i>p</i> value	OR <sub>Hom</sub> (95% CI) <i>p</i> value	OR <sub>Dom</sub> (95% CI) <i>p</i> value	OR <sub>Rec</sub> (95% CI) <i>p</i> value
rs642961								
Allele (G/A)	0.32	85.8/14.2	80.4/19.6	1.47	1.03	4.71	1.30	4.69
Genotype (GG/GA/AA)		74.6/22.3/3.1	65.8/29.1/5.1	(0.87-2.48) 0.14	(0.30-3.58) 0.90	(0.38-58.21) 0.19	(0.41-4.14) 0.65	(0.38-57.41) 0.24
rs708111								
Allele (T/C)	0.04	57.3/42.7	54.4/45.6	1.12	2.25	1.49	2.07	0.84
Genotype (TT/TC/CC)		28.5/57.7/13.8	22.8/63.3/13.9	(0.75-1.67) 0.56	(0.63-8.06) 0.20	(0.27-8.19) 0.56	(0.60-7.13) 0.24	(0.20-3.43) 0.80
rs9879992								
Allele (A/G)	0.17	77.3/22.7	67.1/32.9	1.67	2.19	0.88	2.02	0.59
Genotype (AA/AG/GG)		57.7/39.2/3.1	43.0/48.1/8.9	(1.07-2.59) <b>0.02</b>	(0.74-6.45) 0.14	(0.07-10.51) 0.66	(0.71-5.77) 0.18	(0.05-6.81) 0.68
rs987525								
Allele (C/A)	0.79	73.1/26.9	72.2/27.8	1.04	0.88	2.85	1.10	3.01
Genotype (CC/CA/AA)		53.8/38.5/7.7	54.4/35.4/10.1	(0.67-1.63) 0.83	(0.29-2.65) 0.81	(0.44-18.33) 0.29	(0.39-3.08) 0.86	(0.49-18.32) 0.23
rs1533767								
Allele (G/A)	0.49	65.8/34.2	75.3/24.7	0.62	1.38	0.30	0.98	0.27
Genotype (GG/GA/AA)		44.6/42.3/13.1	57.0/36.7/6.3	(0.40-0.98) <b>0.04</b>	(0.43-4.41) 0.60	(0.04-2.18) 0.39	(0.35-2.78) 0.97	(0.04-1.95) 0.18

HWE: Hardy-Weinberg equilibrium.

**TABLE 3** SNP-SNP interactions in patients with oral squamous cell carcinoma assessed by model-based multifactor dimensionality reduction.

	Single nucleotide polymorphism	NH <sup>a</sup>	betaH <sup>b</sup>	NL <sup>c</sup>	betaL <sup>d</sup>	<i>p</i> value <sup>e</sup>	Perm. <i>p</i> value <sup>f</sup>
2-SNP	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> )	1	1.26	1	-1.70	<b>0.006</b>	<b>0.03</b>
	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs1533767 ( <i>WNT11</i> )	1	1.11	0	NA	<b>0.01</b>	0.09
	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	1.62	1	-0.75	<b>0.02</b>	0.10
3-SNP	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	2	1.65	2	-1.84	<b>0.002</b>	<b>0.02</b>
	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs987525 (8q24) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> )	1	2.11	2	-1.91	<b>0.004</b>	0.07
	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs987525 (8q24) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	3.03	0	NA	<b>0.01</b>	0.10
	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs1533767( <i>WNT11</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	2.82	0	NA	<b>0.01</b>	0.17
	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs1533767( <i>WNT11</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> )	1	1.20	1	-2.27	<b>0.03</b>	0.25
4-SNP	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> ) – rs987525 (8q24)	2	2.63	1	-1.58	<b>0.001</b>	<b>0.03</b>
	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs1533767( <i>WNT11</i> ) – rs987525 (8q24) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	4.46	0	NA	<b>0.009</b>	0.13
	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs1533767( <i>WNT11</i> ) – rs987525 (8q24) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> )	2	2.08	1	-2.15	<b>0.01</b>	0.20
5-SNP	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> ) – rs987525 (8q24) – rs1533767( <i>WNT11</i> )	2	2.89	0	NA	<b>0.004</b>	<b>0.02</b>

<sup>a</sup>Number of significant High-risk genotypes in the interaction. <sup>b</sup>Regression coefficient in step2 for High risk exposition. <sup>c</sup>Number of significant Low-risk genotypes in the interaction. <sup>d</sup>Regression coefficient in step2 for Low risk exposition. <sup>e</sup>*p* value for the interaction model adjusted for covariates. <sup>f</sup>Permutation *p* value for the interaction model.



**TABLE 4** Association of single nucleotide polymorphisms in patients with breast cancer.

	HWE <i>p</i> value	Control (%)	Case (%)	OR <sub>allele</sub> (95% CI) <i>p</i> value	OR <sub>Het</sub> (95% CI) <i>p</i> value	OR <sub>Hom</sub> (95% CI) <i>p</i> value	OR <sub>Dom</sub> (95% CI) <i>p</i> value	OR <sub>Rec</sub> (95% CI) <i>p</i> value
rs642961								
Allele (G/A)	0.84	86.4/13.6	88.1/11.9	0.85	0.73	1.90	1.06	0.87
Genotype (GG/GA/AA)		74.4/24.0/1.6	79.3/17.6/3.1	(0.52-1.41) 0.55	(0.41-1.30) 0.28	(0.36-9.98) 0.70	(0.74-1.52) 0.73	(0.53-1.44) 0.61
rs708111								
Allele (T/C)	0.78	51.2/48.8	48.7/51.3	1.10	0.77	1.35	1.12	1.05
Genotype (TT/TC/CC)		25.6/51.2/23.2	28.9/39.6/31.5	(0.79-1.54) 0.55	(0.50-1.18) 0.23	(0.80-2.28) 0.24	(0.67-1.88) 0.64	(0.78-1.40) 0.73
rs9879992								
Allele (A/G)	0.80	71.9/28.1	72.0/28.0	0.99	0.80	1.52	1.08	0.99
Genotype (AA/AG/GG)		51.2/41.3/7.5	55.4/33.3/11.3	(0.68-1.44) 0.97	(0.51-1.27) 0.35	(0.66-3.50) 0.41	(0.72-1.61) 0.70	(0.69-1.42) 0.98
rs987525								
Allele (C/A)	0.81	67.8/32.2	63.5/36.5	1.20	1.12	1.14	0.84	1.13
Genotype (CC/CA/AA)		45.5/44.6/9.9	38.4/50.3/11.3	(0.84-1.72) 0.29	(0.74-1.71) 0.57	(0.53-2.46) 0.73	(0.54-1.30) 0.44	(0.81-1.57) 0.46
rs1533767								
Allele (G/A)	0.03	68.6/31.4	71.7/28.3	0.86	1.19	0.53	0.99	0.90
Genotype (GG/GA/AA)		51.2/34.7/14.1	50.9/41.5/7.6	(0.59-1.24) 0.42	(0.75-1.88) 0.44	(0.24-1.16) 0.11	(0.66-1.49) 0.97	(0.63-1.27) 0.55

HWE: Hardy-Weinberg equilibrium.

**TABLE 5** SNP-SNP interactions in patients with breast cancer assessed by model-based multifactor dimensionality reduction.

	Single nucleotide polymorphism	NH <sup>a</sup>	betaH <sup>b</sup>	NL <sup>c</sup>	betaL <sup>d</sup>	<i>p</i> value <sup>e</sup>	Perm. <i>p</i> value <sup>f</sup>
2-SNP	rs1533767 ( <i>WNT11</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> )	2	1.01	0	NA	<b>0.003</b>	<b>0.03</b>
	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	0.49	1	-0.98	<b>0.01</b>	<b>0.05</b>
	rs987525 (8q24) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> )	1	1.05	0	NA	<b>0.01</b>	0.10
	rs987525 (8q24) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	0.57	1	-0.96	<b>0.03</b>	0.14
	rs708111 ( <i>WNT3A</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	0.61	0	NA	<b>0.05</b>	0.25
3-SNP	rs1533767( <i>WNT11</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	2	1.23	0	NA	<b>0.002</b>	<b>0.04</b>
	rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> )	1	0.97	2	-1.04	<b>0.002</b>	<b>0.05</b>
	rs987525 (8q24) – rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	0.98	1	-1.27	<b>0.005</b>	0.07
	rs987525 (8q24) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	1.23	1	-1.21	<b>0.007</b>	0.09
	rs1533767 ( <i>WNT11</i> ) – rs987525 (8q24) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	0.88	2	-1.62	<b>0.01</b>	0.11
	rs987525 (8q24) – rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> )	1	1.56	1	-1.13	<b>0.01</b>	0.23
	rs1533767 ( <i>WNT11</i> ) – rs987525 (8q24) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> )	1	1.69	1	-0.71	<b>0.03</b>	0.30
	rs1533767 ( <i>WNT11</i> ) – rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	0.80	1	-1.53	<b>0.03</b>	0.23
4-SNP	rs1533767 ( <i>WNT11</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> ) – rs9879992 ( <i>GSK3β</i> )	0	NA	4	-1.57	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
	rs1533767 ( <i>WNT11</i> ) – rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	2	1.22	1	-1.49	<b>0.006</b>	0.11
	rs1533767 ( <i>WNT11</i> ) – rs987525 (8q24) – rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	0	NA	2	-1.67	<b>0.007</b>	0.10
	rs987525 (8q24) – rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	2.72	0	NA	<b>0.009</b>	0.17
	rs1533767 ( <i>WNT11</i> ) – rs987525 (8q24) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> )	1	2.36	0	NA	<b>0.03</b>	0.25
5-SNP	rs1533767 ( <i>WNT11</i> ) – rs708111 ( <i>WNT3A</i> ) – rs642961 ( <i>IRF6</i> ) – rs9879992 ( <i>GSK3β</i> ) – rs987525 (8q24)	1	1.84	2	-1.90	<b>0.008</b>	0.09

<sup>a</sup>Number of significant High-risk genotypes in the interaction. <sup>b</sup>Regression coefficient in step2 for High risk exposition.

<sup>c</sup>Number of significant Low-risk genotypes in the interaction. <sup>d</sup>Regression coefficient in step2 for Low risk exposition. <sup>e</sup>*p* value for the interaction model adjusted for covariates. <sup>f</sup>Permutation *p* value for the interaction model.

**Supplementary table 1** Distribution of patients with oral squamous cell carcinoma by tumor location.

	n	%
<b>Localization</b>		
Tongue	33	41.8
Retromolar trigone	4	5.1
Mouth floor	23	29.1
Hard palate	11	13.9
Buccal mucosa	7	8.9
Gum	1	1.2
<b>Clinical Staging System</b>		
Stage I	1	1.3
Stage II	9	11.4
Stage III	34	43.0
Stage IV	35	44.3
<b>Treatment</b>		
Surgery only	1	1.2
Radiotherapy only	1	1.2
Surgery + Radiotherapy	6	7.6
Radiotherapy + Chemotherapy	31	39.3
Surgery + Radiotherapy + Chemotherapy	39	49.4
None	1	1.2

**Supplementary table 2** Characteristics of the case (breast cancer) and control groups.

	n	%
<b>Clinical Staging System</b>		
Stage IA	16	10.1
Stage IIA	32	20.1
Stage IIB	31	19.5
Stage IIIA	54	34.0
Stage IIIB	10	6.3
Stage IIIC	3	1.9
Stage IV	2	1.2
No information	11	6.9
<b>Treatment</b>		
Surgery only	7	4.4
Chemotherapy only	2	1.2
Radiotherapy only	1	0.6
Surgery + Radiotherapy	5	3.2
Surgery + Chemotherapy	34	21.4
Radiotherapy + Chemotherapy	7	4.4
Surgery + Radiotherapy + Chemotherapy	97	61.0

**Supplementary table 3** Characteristics of patients with oral squamous cell carcinoma (case group) and controls.

	Case, n (%)	Control, n (%)	<i>p</i> value
<b>Gender</b>			
Male	54 (68.4)	55 (42.3)	
Female	25 (31.6)	75 (57.7)	0.0003
Age	64.6 ± 13.8	43.0 ± 13.0	0.0001
<b>Consumption of Alcohol</b>			
Yes	55 (69.6)	64 (49.2)	
No	24 (30.4)	66 (50.8)	0.004
<b>Smoking</b>			
Yes	69 (87.3)	15 (11.5)	
No	10 (12.7)	115 (88.5)	0.0001

## 6 CONCLUSÕES

Após a realização do presente estudo, pode-se concluir que:

1. Não foram verificadas associações individuais entre os SNPs analisados e o risco de câncer oral e de câncer de mama.
2. Interações entre SNP-SNP, contendo os SNPs em *WNT3A*, *GSK3 $\beta$*  e *WNT11* foram associadas com os cânceres oral e de mama.
3. Associação de rs9879992 em *GSK3 $\beta$*  e rs1533767 em *WNT11* foram significativas para o câncer oral.
4. Associação entre múltiplas interações SNP-SNP envolvendo *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3B*, 8q24 e *WNT11* podem ser fatores de risco para os carcinomas oral e de mama.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Embora os resultados apresentados sejam relevantes, e o tamanho da amostra populacional satisfatório para estudos genéticos, confirmação em grupos populacionais mais amplos e com diversidades étnicas e raciais é necessária.
- As interações epistáticas em genes anteriormente relacionados com as fissuras de lábio e/ou palato não síndrômica e as neoplasias malignas deverão ser melhor compreendidas e interpretadas.
- Os resultados aqui explicitados podem ser ampliados em estudos moleculares e genéticos que possibilitem uma melhor compreensão da interação existente entre duas importantes condições de interesse em saúde coletiva, ou seja, fissuras orais e neoplasias malignas.

## REFERÊNCIAS

- 1- AIDAR, M.; LINE, S.R. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. Braz Dent J, v.18, n.2, p.148-152. 2007.
- 2- ALANAZI, M.S.; PARINE, N.R.; SHAIK, J.P.; ALABDULKARIM, H.A.; AJAJ, S.A. *et al.* Association of Single Nucleotide Polymorphisms in Wnt Signaling Pathway Genes with Breast Cancer in Saudi Patients. PLoS ONE, v.3, n.8, p.55-59. 2013.
- 3- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). What are the key statistics about breast cancer? 2015. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-key-statistics>.
- 4- ANDRADE-FILHO, P.A.; LETRA, A.; CRAMER, A.; PRASAD, J.L.; GARLET, G.P.; VIEIRA, A.R. *et al.* Insights from studies with oral cleft genes suggest associations between WNT-pathway genes and risk of oral cancer. J Dent Res, v.90, n.6, Jun, p.740-6. 2011.
- 5- AQUINO, S.N; PARANAÍBA, L.M.R.; MARTELLI, D.R.B; SWERTS, M.S.O.; BARROS, L.M.; BONAN, P.R.F. *et al.* Study of patients with cleft lip and palate with consanguineous parents. Braz J Otorhinolaryngol, v.77, n.1, Jan-Feb, p.19-23. 2011.
- 6- BAGORDAKI, E.; PARANAIBA, L.M.; BRITO, L.A.; DE AQUINO, S.N.; MESSETTI, A.C.; MARTELLI-JUNIOR, H. *et al.* Polymorphisms at regions 1p22.1 (rs560426) and 8q24 (rs1530300) are risk markers for nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. Am J Med Genet A, v.161A, n.5, May, p.1177-80. 2013.
- 7- BAILEY, C.M.; KHALKHALI-ELLIS, Z.; KONDO, S.; MARGARYAN, N.V.; SEFTOR, R.E.; WHEATON, W.W.; AMIR, S.; PINS, M.R.; SCHUTTE, B.C.; HENDRIX, M.J. Mammary serine protease inhibitor (Maspin) binds directly to interferon regulatory factor 6: identification of a novel serpin partnership. J Biol Chem, v.280, n.40, Oct 7, p.34210-7. 2005.
- 8- BAILEY, C.M.; HENDRIX, M.J.C. *IRF6* in development and disease: a mediator of quiescence and differentiation. Cell Cycle, v.7, n.13, Jul 1, p.1925-30. 2008.
- 9- BEATY, T.H.; MURRAY, J.C.; MARAZITA, M.L.; MUNGER, R.G.; RUCZINSKI, I.; HETMANSKI, J.B. *et al.* A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. Nat Genet, v.42, n.6, Jun, p.525-9. 2010.
- 10- BEATY, T.H., MARAZITA, M.L., LESLIE, E.J. Genetic factors influencing risk to orofacial clefts: today's challenges and tomorrow's opportunities. F1000Res, v.5, p.2800. 2016.



- 11- 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. Am J Epidemiol, v.161, n.11, Jun 1, p.1047-55. 2005.
- 12- BIRNBAUM S.; LUDWIG, K.U.; REUTTER, H.; HERMS, S.; STEFFENS, M.; RUBINI, M. *et al.* Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. Nat Genet, v.41, n.4, Apr, p.473-7. 2009.
- 13- BLANTON, S.H.; CORTEZ, A.; STAL, S.; MULLIKEN, J.B.; FINNELL, R.H.; HECHT, J.T. Variation in *IRF6* contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. Am J Med Genet A, v.137A, n.3, Sep 1, p.259-62. 2005.
- 14- BOHMER, A.C.; MANGOLD, E.; TESSMANN, P.; MOSSEY, P.A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.; LINDEMANS, J. *et al.* Analysis of susceptibility locus for nonsyndromic orofacial clefting in a European trio sample. Am J Med Genet A, v.161A, n.10, Oct, p.2545-9. 2013.
- 15- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer: INCA, p.124, 2014.
- 16- BREWER, C.; HOLLOWAY, S.; ZAWALNYSKI, P.; SCHINZEL, A.; FITZ-PATRICK, D. A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality--and tolerance of segmental aneuploidy--in humans. Am J Hum Genet, v.64, n.6, Jun, p.1702-8. 1999.
- 17- BRITO, L.A.; PARANAIBA, L.M.R.; BASSI, C.F.S.; MASOTTI, C.; MALCHER, C.; SCHLESINGER, D. *et al.* Region 8q24 is a susceptibility locus for nonsyndromic oral clefting in Brazil. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.94, n.6, Jun, p.464-8. 2012.
- 18- BRITO, L.A.; BASSI, C.F.; MASOTTI, C.; MALCHER, C.; ROCHA, K.M.; SCHLESINGER, D. *et al.* *IRF6* is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population. Am J Med Genet A, v.158A, n.9, Sep, p.2170-5. 2012.
- 19- BUFALINO, A.; PARANAÍBA, L.M.R.; AQUINO, S.N.; MARTELLI-JÚNIOR, H.; SWERTS, M.S.O.; COLETTA, R.D. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.88, n.11, Nov, p.980-6.
- 20- BUI, A.H.; AYUB, A.; AHMED, M.K.; TAIOLI, E.; TAUB, P.J. Association Between Cleft Lip and/or Cleft Palate and Family History of Cancer: A Case-Control Study. Ann Plast Surg, Jan 31. 2018.
- 21- BUTALI, A.; LITTLE, J.; CHEVRIER, C.; CORDIER, S.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.; JUGESSUR, A.; OLADUGBA, B.; MOSSEY, P.A. Folic acid supplementation use and the MTHFR C677T polymorphism in orofacial clefts etiology: An individual participant data pooled-analysis. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.97, n.8, Aug, p.509-14. 2013.

- 22- CALLE, M.L.; URREA, V.; MALATS, N.; VAN STEEN, K. mbmdr: an R package for exploring gene–gene interactions associated with binary or quantitative traits. Bioinformatics, v.26, n.17, p.2198-2199. 2010.
- 23- CHI, A.C.; DAY, T.A.; NEVILLE, B.W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. CA Cancer J Clin, v.65, n.5, Sep-Oct, p.401-21. 2015.
- 24- CHIQUET, B.T.; BLANTON, S.H.; BURT, A.; MA, D.; STAL, S.; MULLIKEN, J.B.; HECHT, J.T. Variation in WNT genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. Hum Mol Genet, v.17, n.14, Jul 15, p.2212-8. 2008.
- 25- CHRISTENSEN, K.; JUEL, K.; HERSKIND, A.M.; MURRAY, J.C. Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. Bmj, v.328, n.7453, Jun 12, p.1405. 2004.
- 26- CROWTHER-SWANEPOEL, D.; BRODERICK, P.; DI BERNARDO, M.C.; DOBBINS, S.E.; TORRES, M.; MANSOURI, M. *et al.* Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. Nat Genet, v.42, n.2, Feb, p.132-6. 2010.
- 27- DEDIVITIS, R.A.; FRANÇA, C.M.; MAFRA, A.C.; GUIMARÃES, F.T.; GUIMARÃES, A.V. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. Rev Bras Otorrinolaringol, v.70, n.1, p.35-40, 2004.
- 28- DIXON, M.J.; MARAZITA, M.L.; BEATY, TH.; MURRAY, J.C. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. Nat Rev Genet, v.12, n.3, Mar, p.167-78. 2011.
- 29- DUGGAN, C.; BALLARD-BARBASH, R.; BAUMGARTNER, R.N.; BAUMGARTNER, K.B.; BERNSTEIN, L.; MCTIERNAN, A. Associations between null mutations in *GSTT1* and *GSTM1*, the *GSTP1* Ile(105)Val polymorphism, and mortality in breast cancer survivors. Springer plus, v.2, p.450. 2013.
- 30- EASTON, D.F.; POOLEY, K.A.; DUNNING, A.M.; PHAROAH, P.D.; THOMPSON, D.; BALLINGER, D.G. *et al.* Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility *locus*. Nature, v.447, n.7148, Jun 28, p.1087-93. 2007.
- 31- EELES RA, KOTE-JARAI Z, AL OLAMA AA, GILES GG, GUY M, SEVERI G, *et al* Identification of seven new prostate cancer susceptibility *locus* through a genome-wide association study. Nat Genet, v.41, n.10, Oct, p.1116-21. 2009.
- 32- FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer, v.127, n.12, Dec 15, p.2893-917. 2010.
- 33- FOGH-ANDERSEN, P. Inheritance of harelip and cleft palate; contribution to the elucidation of the etiology of the congenital clefts of the face. Busck, Copenhagen, 1942.

- 34- FONSECA, E.; BRIZON, V.; LOPES, A.; MILAGRES, C.; FREITAS, B.; MENEGHIM, M. Mortalidade por câncer de boca em Minas Gerais, Brasil. Rev. Bras. Pesq. Saúde, v.16, n.3, p.99-106, 2014.
- 35- GONZÁLEZ, J.R.; ARMENGOL, L.; SOLÉ, X.; GUINÓ, E.; MERCADER, J.M.; ESTIVILL, X.; MORENO, V. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. Bioinformatics, v.23, n.5, p.644-645. 2007.
- 36- GHAZALI, N.; ROGERS, S.N. The Head and Neck Cancer Patient Concerns Inventory (PCI): A Practical Holistic Assessment Tool in Outpatient Setting. PRO Newsletter, v.45, p.1-4, 2011.
- 37- GONG, S.G.; GONG, T.W.; SHUM, L. Identification of markers of the midface. J Dent Res, v.84, n.1, Jan, p.69-72. 2005.
- 38- GORLIN, R.; COHEN, M.; HENNEKAM, R. Syndromes of the head and neck. 4. ed. New York: Oxford University Press; 2001.
- 39- GRANT, S.F.; WANG, K.; ZHANG, H.; GLABERSON, W.; ANNAIAH, K.; KIM, C.E. *et al.* A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. J Pediatr, v.155, n.6, Dec, p.909-13. 2009.
- 40- GRISANZIO, C.; FREEDMAN, M.L. Chromosome 8q24-Associated Cancers and *MYC*. Genes Cancer, v.1, n.6, Jun, p.555-9. 2010.
- 41- GROSEN, D.; CHEVRIER, C.; SKYTTHE, A.; BILLE, C.; MOLSTED, K.; SIVERTSEN, A. *et al.* A cohort study of recurrence patterns among more than 54,000 relatives of oral cleft cases in Denmark: support for the multifactorial threshold model of inheritance. J Med Genet, v.47, n.3, Mar, p.162-8. 2010.
- 42- GHOUSSAINI, M.; SONG, H.; KOESSLER, T.; AL OLAMA, A.A.; KOTE-JARAI, Z.; DRIVER, K.E. *et al.* Multiple *locus* with different cancer specificities within the 8q24 gene desert. J Natl Cancer Inst, v.100, n.13, Jul 2, p.962-6. 2008.
- 43- GUDMUNDSSON, J.; SULEM, P.; MANOLESCU, A.; AMUNDADOTTIR, L.T.; GUDBJARTSSON, D.; HELGASON, A. *et al.* Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. Nat Genet, v.39, n.5, May, p.631-7. 2007.
- 44- HA S, KOH KS, MOON H, JUNG S, OH TS. Clinical Outcomes of Primary Palatal Surgery in Children with Nonsyndromic Cleft Palate with and without Lip. BioMed Research International, p.185459. 2015.
- 45- HARRIS, S.L.; KIMPLE, R.J.; HAYES, N.D.; COUCH, M.R.; ROSENMAN, J.G. Never-smokers, never-drinkers: unique clinical subgroup of young patients with head and neck squamous cell cancers. Head Neck, v.32, n.4, Apr, p.499-503. 2010.
- 46- HIGGINS, A.W.; ALKURAYA, F.S.; BOSCO, A.F.; BROWN, K.K.; BRUNS, G.A.; DONOVAN, D.J. *et al.* Characterization of apparently balanced chromosomal

- rearrangements from the developmental genome anatomy project. Am J Hum Genet, v.82, n.3, Mar, p.712-22. 2008.
- 47- INCA - Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama. Rio de Janeiro (Brasil): INCA, 2011.
- 48- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Ministério da Saúde. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): INCA, 2014.
- 49- INCA- Instituto Nacional De Câncer; Ministério da Saúde. Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): INCA, 2015.
- 50- INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipo de câncer: Boca. 2017. Disponível em:<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca/definicao>>.
- 51- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Ministério da Saúde. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): INCA, 2018.
- 52- JOHNSON, N.W.; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A.A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. Periodontol 2000, v.57, n.1, Oct, p.19-37. 2011.
- 53- JUGESSUR, A.; RAHIMOV, F.; LIE, R.T.; WILCOX, A.J.; GJESSING, H.K.; NILSEN, R.M. *et al.* Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway. Genet Epidemiol, v.32, n.5, Jul, p.413-24. 2008.
- 54- JURIOFF, D.M.; HARRIS, M.J.; DEWELL, S.L.; BROWN, C.J.; MAGER, D.L.; GAGNIER, L. *et al.* Investigations of the genomic region that contains the *clif1* mutation, a causal gene in multifactorial cleft lip and palate in mice. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.73, n.2, Feb, p.103-13. 2005.
- 55- JURIOFF, D.M.; HARRIS, M.J. Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.82, n.2, Feb, p.63-77. 2008.
- 56- KANAAN, Z.M.; MAHFOUZ, R.; TAMIM, H. The prevalence of consanguineous marriages in an underserved area in Lebanon and its association with congenital anomalies. Genet Test, v.12, n.3, Sep, p.367-72. 2008.
- 57- KIM, M.; DATTA, A.; BRAKEMAN, P.; YU, W.; MOSTOV, K.E. Polarity proteins PAR6 and aPKC regulate cell death through GSK-3beta in 3D epithelial morphogenesis. J Cell Sci, v.120, n.Pt 14, Jul 15, p.2309-17. 2007.
- 58- KIMPLE, A.J.; WELCH, C.M.; ZEVALLOS, J.P.; PATEL, S.N. Oral cavity squamous cell carcinoma--an overview. Oral Health Dent Manag, v.13, n.3, Sep, p.877-82. 2014.

- 59- KOHLI, S.S.; KOHLI, V.S. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. J Oral Maxillofac Pathol, v.16, n.1, Jan, p.64-72. 2012.
- 60- KONDO, S.; SCHUTTE, B.C.; RICHARDSON, R.J.; BJORK, B.C.; KNIGHT, A.S.; WATANABE, Y. *et al.* Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. Nat Genet, v.32, n.2, Oct, p.285-9. 2002.
- 61- KOWALSKI, L.P.; NISHIMOTO, I.N. Epidemiologia do câncer de boca. In: Parise Jr. O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. Sarvier, São Paulo, p.3-11, 2000.
- 62- KÜCHLER, E.C.; SABÓIA, 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 Odontol Scand, v.72, n.8, Nov, p.1070-8. 2014.
- 63- LAMMI, L.; ARTE, S.; SOMER, M.; JARVINEN, H.; LAHERMO, P.; THESLEFF, I. Mutations in *AXIN2* cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. Am J Hum Genet, v.74, n.5, May, p.1043-50. 2004.
- 64- LAN, Y.; RYAN, R.C.; ZHANG, Z.; BULLARD, S.A.; BUSH, J.O.; MALTBY, K.M. *et al.* Expression of Wnt9b and activation of canonical Wnt signaling during midfacial morphogenesis in mice. Dev Dyn, v.235, n.5, May, p.1448-54. 2006.
- 65- LEITE, I.C.; KOIFMAN, S. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. Braz Oral Res, v.23, n.1, Jan-Mar, p.31-7. 2009.
- 66- LETRA, A.; MENEZES, R.; FONSECA, R.F.; GOVIL, M.; MCHENRY, T.; MURPHY, M.J. *et al.* *AXIN2* and *CDH1* polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.85, n.2, Feb, p.169-73. 2009.
- 67- LETRA, A.; MENEZES, R.; FONSECA, R.F.; GOVIL, M.; MCHENRY, T.; MURPHY, M.J. *et al.* Novel cleft susceptibility genes in chromosome 6q. J Dent Res, v.89, n.9, Sep, p.927-32. 2010.
- 68- LETRA, A.; MENEZES, R.; GOVIL, M.; FONSECA, R.F.; MCHENRY, T.; GRANJEIRO, J.M. *et al.* Follow-up association studies of chromosome region 9q and nonsyndromic cleft lip/palate. Am J Med Genet A, v.152, n.7, p.1701-10. 2010.
- 69- LETRA, A.; BJORK, B.; COOPER, M.E.; SZABO-ROGERS, H.; DELEYIANNIS, F.W.B.; FIELD, L.L. *et al.* Association of *AXIN2* with non-syndromic oral clefts in multiple populations. J Dent Res, v.91, n.5, May, p.473-8. 2012.
- 70- LEE, J.C.; CHUNG, L.C.; CHEN, Y.J.; FENG, T.H.; JUANG, H.H. N-myc downstream-regulated gene 1 downregulates cell proliferation, invasiveness, and tumorigenesis in human oral squamous cell carcinoma. Cancer Lett, v.355, n.2, Dec 28, p.242-52. 2014.

- 71- LIANG, H.; YAN, Y.; LI, T.; LI, R.; LI, M.; LI, S.; QIN, X. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms and breast cancer risk in Chinese population: a meta-analysis of 22 case-control studies. Tumour Biol, v.35, n.2, Feb, p.1695-701. 2014.
- 72- LIU, K.J.; ARRON, J.R.; STANKUNAS, K.; CRABTREE, G.R.; LONGAKER, M.T. Chemical rescue of cleft palate and midline defects in conditional GSK-3 $\beta$  mice. Nature, v.446, n.7131, Mar 1, p.79-82. 2007.
- 73- LIU, F.; MILLAR, S.E. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in oral tissue development and disease. J Dent Res, v.89, n.4, Apr, p.318-30. 2010.
- 74- LUDWIG, K.U.; MANGOLD, E.; HERMS, S.; NOWAK, S.; REUTTER, H.; PAUL, A. *et al.* Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk *locus*. Nat Genet, v.44, n.9, Sep, p.968-71. 2012.
- 75- LUO, Y.L., CHENG, Y.L., YE, P., WANG, W., GAO, X.H., CHEN, Q. Association between *MTHFR* polymorphisms and orofacial clefts risk: a meta-analysis. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.94, n.4, Apr, p.237-44. 2012.
- 76- MACHAO, R.A.; MOREIRA, H.S.; DE AQUINO, S.N.; MARTELLI-JUNIOR, H.; DE ALMEIDA, R.S.R.; PERSUHN, D.C.; WU, T.; YUAN, Y.; COLETTA, R.D. 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, v.170, n.2, p.536-9. 2016.
- 77- MACHADO, R.A.; FREITAS, E.M.; AQUINO, S.N.; MARTELLI, D.R.B.; SWERTS, M.S.O.; REIS, S.R.A.; PERSUHN, D.C.; MOREIRA, H.S.B.; DIAS, V.O.; D. COLETTA, R.; MARTELLI-JÚNIOR, H. Clinical relevance of breast and gastric cancer-associated polymorphisms as potential susceptibility markers for oral clefts in the Brazilian population. BMC Med Genet, v.18, n.1, Apr 4, p.39. 2017.
- 78- MACHADO, R.A.; NOGUEIRA, E.N.; MARTELLI-JÚNIOR, H.; REIS, S.R.; PERSUHN, D.C.; D COLETTA, R.D. 2p24.2 (rs7552) is a susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. Clin Genet, v.93, p.28. 2018a.
- 79- MACHADO, A.R.; DE TOLEDO, I.P.; MARTELLI-JÚNIOR, H.; REIS, S.R.; NEVES, S.G.E.; D COLETTA, R. Potential genetic markers for nonsyndromic oral clefts in the Brazilian population: A systematic review and meta-analysis. Birth Defects Res, v.110, p.2-3. 2018b.
- 80- MANGOLD, E.; LUDWIG, K.U.; BIRNBAUM, S.; BALUARDO, C.; FERRIAN, M.; HERMS, S. *et al.* Genome-wide association study identifies two susceptibility *locus* for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. Nat Genet, v.42, n.1, Jan, p.24-6. 2010.
- 81- MANGOLD, E.; LUDWIG, K.U.; NÖTHEN, M.M. Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. Trends Mol Med, v.17, n.12, p.725-33. 2011.

- 82- MANI, P.; JARRELL, A.; MYERS, J.; ATIT, R. Visualizing canonical Wnt signaling during mouse craniofacial development. Dev Dyn, v.239, n.1, Jan, p.354-63. 2010.
- 83- MARAZITA, M.L.; LIDRAL, A.C.; MURRAY, J.C.; FIELD, L.L.; MAHER, B.S.; GOLDSTEIN MCHENRY, T. *et al.* Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. Hum Hered, v.68, n.3, p.151-70. 2009.
- 84- MARAZITA, M.L. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. Annu Rev Genomics Hum Genet, v.13, p.263-83. 2012.
- 85- MARAZITA, M.L.; MOONEY, M.P. Mooney. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. Clin Plast Surg, v.31, n.2, Apr, p.125-40. 2004.
- 86- MARTELLI-JÚNIOR, H.; ORSI JÚNIOR, J.; CHAVES M.R.; BARROS L.M.; BONAN, P.R.F.; FREITAS, J.A. Estudo epidemiológico das fissuras labiais e palatais em Alfenas - Minas Gerais - de 1986 a 1998. RPG, v.13, n.1, p.31-35. 2006.
- 87- MARTELLI-JUNIOR, H.; PORTO, L.V.; MARTELLI, D.R.; BONAN, P.R.F.; 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. Braz Oral Res, v.21, n.4, Oct-Dec, p.314-7. 2007.
- 88- MARTELLI, D.R.; BONAN, P.R.F.; SOARES, M.C.; PARANAIBA, L.R.; MARTELLI-JUNIOR, H. Analysis of familial incidence of non-syndromic cleft lip and palate in a Brazilian population. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, v.15, n.6, Nov 1, p.898-901. 2010.
- 89- MARTELLI, D.R.; MACHADO, R.A.; SWERTS, M.S.; RODRIGUES, L.A.; AQUINO, S.N.; MARTELLI JUNIOR, H. Non syndromic cleft lip and palate: relationship between sex and clinical extension. Braz J Otorhinolaryngol, v.78, n.5, Oct, p.116-20. 2012.
- 90- MARTINS, A.M.E.B.L.; SOUZA, J.G.S.; SANTOS-NETO, P.E; ELEUTÉRIO, N.B.; HAIKAL, D.S.; SILVEIRA, MF.; PAULA, A.M.B.; GUIMARÃES, A.L.S.G.; FERREIRA, R.C.; PORDEUS, I.A. Prevenção do Câncer de Boca: Acesso à informações e comportamento entre idosos de Montes Claros-MG. Revista Unimontes Científica. Montes Claros, v.14, n.1, p.141-153. 2012.
- 91- MELATH, A.; SANTHAKUMAR, G.K.; MADHAVANNAIR, S.S.; NEDUMGOTTIL, B.M.; RAMANATHAN, A. A novel heterozygous mutation (F252Y) in exon 7 of the *IRF6* gene is associated with oral squamous cell carcinomas. Asian Pac J Cancer Prev, v.14, n.11, p.6803-6. 2013.
- 92- MELO, L.; DA SILVA, M.; BERNARDO, J.; MARQUES, E.D.; LEITE, I.C. Perfil epidemiológico de casos incidentes de câncer de boca e faringe. Rev Gaúcha Odontol., v.58, n.3, p.351-355. 2010.

- 93- MENEZES, R.; MARAZITA, M.L.; MCHENRY, T.G.; VIEIRA, A.R. *AXIS* inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. J Am Dent Assoc, v.140, n.1, Jan, p.80-4. 2009.
- 94- MENEZES R.; LETRA, A.; KIM, A.H.; KÜCHLER, E.C.; DAY, A.; TANNURE, P.N. *et al.* Studies with Wnt genes and nonsyndromic cleft lip and palate. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.88, n.11, Nov, p.995-1000. 2010.
- 95- MENG, L.; BIAN, Z.; TORENSMA, R.; VON DEN HOFF, J.W. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. J Dent Res, v.88, n.1, Jan, p.22-33. 2009.
- 96- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama 2nd. ed. Brasília (Brasil): Ministério da Saúde. 2013.
- 97- MISHRA, R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. Mol Cancer, v.9, Jun 11, p.144. 2010.
- 98- MOORE, S.R.; JOHNSON, N.W.; PIERCE, A.M.; WILSON, D.F. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. Oral Dis, v.6, n.2, Mar, p.75-84. 2000.
- 99- MORENO, L.M.; MANSILLA, M.A.; BULLARD, S.A.; COOPER, M.E.; BUSCH, T.D.; MACHIDA, J. *et al.* *FOXE1* association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. Hum Mol Genet, v.18, n.24, Dec 15, p.4879-96. 2009.
- 100- MORRISON, K.; PAPAPETROU, C., HOL, F.A.; MARIMAN, E.C.; LYNCH, S.A.; BURN, J.; EDWARDS, Y.H. Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. Ann Hum Genet, v.62, n.Pt 5, Sep, p.379-96. 1998.
- 101- MOSSEY, P.A.; LITTLE, J.; MUNGER, R.G.; DIXON, M.J.; SHAW, W.C. Cleft lip and palate. Lancet, v.374, n.9703, Nov 21, p.1773-85. 2009.
- 102- MOSTOWSKA, A.; HOZYASZ, K.K.; WOJCICKI, P.; BIEDZIAK, B.; PARADOWSKA, P.; JAGODZINSKI, P.P. Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the polish population. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.88, n.7, Jul, p.538-45. 2010.
- 103- MUKHOPADHYAY, P.; GREENE, R.M.; ZACHARIAS, W.; WEINRICH, M.C.; SINGH, S.; YOUNG, W.W.; PISANO, M.M. Developmental gene expression profiling of mammalian, fetal orofacial tissue. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.70, n.12, Dec, p.912-26. 2004.
- 104- MURRAY, T.; TAUB, MA.; RUCZINSKI, I.; SCOTT, AF.; HETMANSKI, J.B.; SCHWENDER, H. *et al.* Examining markers in 8q24 to explain differences in evidence for association with cleft lip with/without cleft palate between Asians and Europeans. Genet Epidemiol, v.36, n.4, May, p.392-9. 2012.



- 105- MURTHY, J.; BHASKAR, L. Current concepts in genetics of nonsyndromic clefts. Indian J Plast Surg, v.42, n.1, Jan-Jun, p.68-81. 2009.
- 106- NAGY, I.I.; RAILO, A.; RAPILA, R.; HAST, T.; SORMUNEN, R.; TAVI, P. *et al.* *Wnt-11* signalling controls ventricular myocardium development by patterning N-cadherin and beta-catenin expression. Cardiovasc Res, v.85, n.1, Jan 1, p.100-9. 2010.
- 107- NAROD, S.A.; HAWKINS, M.M.; ROBERTSON, C.M.; STILLER, C.A. Congenital anomalies and childhood cancer in Great Britain. Am J Hum Genet, v.60, n.3, Mar, p.474-85. 1997.
- 108- NATSUME, N.; KAWAI, T.; KOHAMA, G.; TESHIMA, T.; KOCHI, S.; OHASHI, Y. *et al.* Incidence of cleft lip or palate in 303738 Japanese babies born between 1994 and 1995. Br J Oral Maxillofac Surg, v.38, n.6, Dec, p.605-607. 2000.
- 109- NISHI, M.; MIYAKE, H, TAKEDA T, HATAE Y. Congenital malformations and childhood cancer. Med Pediatr Oncol, v.34, n.4, Apr, p.250-4. 2000.
- 110- PAN W.; CHOI, S.C.; WANG, H., QIN, Y.; VOLPICELLI-DALEY, L.; SWAN, L. *et al.* Wnt3a-mediated formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates LRP6 phosphorylation. Science, v.321, n.5894, p.1350-3. 2008.
- 111- PARANAIBA, L.M.; BUFALINO, A.; MARTELLI-JUNIOR, H.; DE BARROS, L.M.; GRANER, E.; COLETTA, R.D. Lack of association between *IRF6* polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. Oral Dis, v.16, n.2, Mar, p.193-7. 2010.
- 112- PARK, J.W.; MCINTOSH, I.; HETMANSKI, J.B.; JABS, E.W.; VANDER KOLK, C.A.; WU-CHOU, Y.H. *et al.* Association between *IRF6* and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. Genet Med, v.9, n.4, Apr, p.219-27. 2007.
- 113- PATEL, S.C.; CARPENTER, W.R.; TYREE, S.; COUCH, M.E.; WEISSLER, M.; HACKMAN, T.; HAYES, D.N.; SHORES, C.; CHERA, B.S. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. J Clin Oncol, v.29, n.11, Apr 10, p.1488-94. 2011.
- 114- PENG, C.H.; LIAO, C.T.; PENG, S.C.; CHEN, Y.J.; CHENG, A.J.; JUANG, J.L.; *et al.* A novel molecular signature identified by systems genetics approach predicts prognosis in oral squamous cell carcinoma. PLoS One, v.6, n.8, p.23452. 2011.
- 115- PINTO, E.B. Identificação de polimorfismos genéticos de suscetibilidade às fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas em uma população brasileira [Dissetação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP. 2012.
- 116- PORNTAVEETUS, T.; OHAZAMA, A.; CHOI, H.Y.; HERZ, J.; SHARPE, P.T. Wnt signaling in the murine diastema. Eur J Orthod, v.34, n.4, Aug, p.518-24. 2012.

- 117- RAHIMOV, F.; MARAZITA, M.L.; VISEL, A.; COOPER, M.E.; HITCHLER, M.J.; RUBINI, M. *et al.* Disruption of an AP-2alpha binding site in an *IRF6* enhancer is associated with cleft lip. Nat Genet, v.40, n.11, Nov, p.1341-7. 2008.
- 118- RAHIMOV, F.; JUGESSUR, A.; MURRAY, J. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. Cleft Palate Craniofac J, v.49, n.1, Jan, p.73-91. 2012.
- 119- RAMIREZ, D.; LAMMER, E.J.; IOVANNISCI, D.; LAURENT, C.; FINNEL, R.H.; SHAW, G.M. Maternal smoking during early pregnancy, *GSTP1* and *EPHX1* variants, and risk of isolated orofacial clefts. Cleft Palate Craniofac J, v.44, n.4, Jul, p.366-73. 2007.
- 120- REREDDY, S.K.; JORDAN, D.R.; MOORE, C.E. Dying to be Screened: Exploring the Unequal Burden of Head and Neck Cancer in Health Provider Shortage Areas. J Cancer Educ, v.30, n.3, Sep, p.490-6. 2015.
- 121- RILEY, B.M.; SCHULTZ, R.E.; COOPER, M.E.; GOLDSTEIN-MCHENRY, T.; DAACK-HIRSCH, S.; LEE, K.T. *et al.* A genome-wide linkage scan for cleft lip and cleft palate identifies a novel locus on 8p11-23. Am J Med Genet A, v.143A, n.8, Apr 15, p.846-52. 2007.
- 122- ROJAS-MARTINEZ, A.; REUTTER, H.; CHACON-CAMACHO, O.; LEON-CACHON, R.B.; MUNOZ-JIMENEZ, S.G.; NOWAK, S. *et al.* Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population: Evidence for *IRF6* and variants at 8q24 and 10q25. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.88, n.7, Jul, p.535-7. 2010.
- 123- SABÓIA, T.M.; REIS, M.F.; MARTINS, Â.M.; ROMANOS, H.F.; TANNURE, P.N.; GRANJEIRO, J.M.; *et al.* *DLX1* and *MMP3* contribute to oral clefts with and without positive family history of cancer. Arch Oral Biol, v.60, n.2, Feb, p.223-8. 2015.
- 124- SCAPOLI, L.; PALMIERI, A.; MARTINELLI, M.; PEZZETTI, F.; CARINCI, P.; TOGNON, M. *et al.* Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the *IRF6* locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. Am J Hum Genet, v.76, n.1, Jan, p.180-3. 2005.
- 125- SCHNEIDER, I.J.C.; GIEHL, M.W.C.; BOING, A.F.; D'ORSI, E. Rastreamento mamográfico do câncer de mama no Sul do Brasil e fatores associados: estudo de base populacional. Cad. Saúde Pública, v.30, n.9, p.1987-1997. 2014.
- 126- SIVERTSEN, A.; WILCOX, A.J.; SKJAERVEN, R.; VINDENES, H.A.; ABYHOLM, F.; HARVILLE, E. *et al.* Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. Bmj, v.336, n.7641, Feb 23, p.432-4. 2008.
- 127- SPERBER, G.H. Formation of the primary palate. In: Wyszynski DFE, editor. *Cleft Lip and Palate: from Origin to Treatment*. Oxford University Press: p.5–13. 2002.

- 128- SPINA, V.; PSILLAKIS, J.M.; LAPA, F.S.; FERREIRA, M.C. Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes. Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo, v.27, n.1, p.5-6. 1972.
- 129- STANIER, P.; MOORE, G.E. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. Hum Mol Genet, v.13 Spec No 1, Apr 1, p.73-81. 2004.
- 130- STUPPIA, L.; CAPOGRECO, M.; MARZO, G.; LA ROVERE, D.; ANTONUCCI, I.; GATTA, V. *et al.* Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate. J Craniofac Surg, v.22, n.5, Sep, p.1722-6. 2011.
- 131- 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 Invest, v.28, n.9, Nov, p.958-62. 2010.
- 132- TOMITA, D.; YAMAGUCHI, T.; NAKAWAKI, T.; HIKITA, Y.; ADEL, M.; KIM, Y.I.; HAGA, S.; TAKAHASHI, M.; KAWAGUCHI, A.; ISA, M.; PARK, S.B.; ISHIDA, H.; MAKI, K.; KIMURA, R. Interferon regulatory factor 6 variants affect nasolabial morphology in East Asian populations. Arch Oral Biol, v.85, Jan, p.142-147. 2018.
- 133- TOMLINSON, I.P.; WEBB, E.; CARVAJAL-CARMONA, L.; BRODERICK, P.; HOWARTH, K.; PITTMAN, A.M. *et al.* A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility *locus* on chromosomes 10p14 and 8q23.3. Nat Genet, v.40, n.5, May, p.623-30. 2008.
- 134- TORRES-PEREIRA, C. Oral cancer public policies: is there any evidence of impact? Braz Oral Res, v.24 Suppl 1, p.37-42. 2010.
- 135- VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. Oral Oncol, v.45, n.4-5, Apr-May, p.317-23. 2009.
- 136- VINCENT-CHONG, V.K.; ISMAIL, S.M.; RAHMAN, Z.A.; SHARIFAH, N.A.; ANWAR, A.; PRADEEP, P.J. *et al.* Genome-wide analysis of oral squamous cell carcinomas revealed over expression of ISG15, Nestin and WNT11. Oral Dis, v.18, n.5, Jul, p.469-76. 2012.
- 137- VIEIRA, A.R.; ORIOLI, I.M.; MURRAY, J.C. Maternal age and oral clefts: a reappraisal. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.94, n.5, Nov, p.530-5. 2002.
- 138- VIEIRA, AR. Unraveling human cleft lip and palate research. J Dent Res, v.87, n.2, Feb, p.119-25. 2008.
- 139- VIEIRA, A.R.; KHALIQ, S.; LACE, B. Risk of cancer in relatives of children born with isolated cleft lip and palate. Am J Med Genet A, v.158A, n.6, Jun, p.1503-4. 2012.

- 140- WANG, X.; GOODE, E.L.; FREDERICKSEN, Z.S.; VIERKANT, R.A.; PANKRATZ, V.S. *et al.* Association of genetic variation in genes implicated in the beta-catenin destruction complex with risk of breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.17, n.8, Aug, p.2101-8. 2008.
- 141- WANG, Y.; LI, X.; ZHU, W.L.; GUO, J.Z.; SONG, X.M.; LI, S.Q. *et al.* Genome-wide and interaction linkage scan for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in two multiplex families in Shenyang, China. Biomed Environ Sci, v.23, n.5, Oct, p.363-70. 2010.
- 142- WARNAKULASURIYA, S. Causes of oral cancer--an appraisal of controversies. Br Dent J, v.207, n.10, Nov 28, p.471-5. 2009.
- 143- WEHBY, G.L.; CASSELL, C.H. The impact of orofacial clefts on quality of life and healthcare use and costs. Oral Dis, v.16, n.1, p.3-10. 2010.
- 144- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 Globocan. 2012. Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
- 145- WYSZYNSKI, D.F.; ALBACHA-HEJAZI, H.; ALDIRANI, M.; HAMMOD, M.; SHKAIR, H.; KARAM, A. *et al.* A genome-wide scan for *locus* predisposing to non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in two large Syrian families. Am J Med Genet A, v.123A, n.2, Dec 1, p.140-7. 2003.
- 146- YAMAGUCHI, TP.; TAKADA, S.; YOSHIKAWA, Y.; WU, N.; MCMAHON, A.P. T (Brachyury) is a direct target of *WNT3A* during paraxial mesoderm specification. Genes Dev, v.13, n.24, Dec 15, p.3185-90. 1999.
- 147- YEAGER, M.; ORR, N.; HAYES, R.B.; JACOBS, K.B.; KRAFT, P.; WACHOLDER, S. *et al.* Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. Nat Genet, v.39, n.5, May, p.645-9. 2007.
- 148- YU, L.; CHEN, J. Association of MTHFR Ala222Val (rs1801133) polymorphism and breast cancer susceptibility: An update meta-analysis based on 51 research studies. Diagn Pathol, v.7, Dec 7, p.171. 2012.
- 149- ZANKE, B.W.; GREENWOOD, C.M.; RANGREJ, J.; KUSTRA, R.; TENESA, A.; FARRINGTON, S.M. *et al.* Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. Nat Genet, v.39, n.8, Aug, p.989-94. 2007.
- 150- 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. Br J Cancer, v.87, n.5, Aug 27, p.524-8. 2002.
- 151- ZUCCHERO, T.; COOPER, M.E.; MAHER, B.S.; DAACK-HIRSCH, S.; NEPOMUCENO, B.; RIBEIRO, L. *et al.* Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene

variants and the risk of isolated cleft lip or palate. N Engl J Med, v.351, n.8, Aug 19, p.769-80. 2004.

## APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - *Pesquisa câncer de boca*.

**Título da pesquisa:** Análise de polimorfismos em genes associados às fissuras de lábio e/ou palato em pacientes com carcinoma de células escamosas de boca: estudo caso-controle pareado com ancestralidade.

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

**Coordenador(a):** Hercílio Martelli Júnior

**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:** O objetivo deste estudo será identificar polimorfismos em genes previamente associados às FL/PNS em pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular bucal, em uma abordagem caso-controle. Desta forma, o presente estudo analisará a frequência dos polimorfismos rs642961, rs708111, rs9879992, rs987525 e rs1533767 contidos nos genes *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3B*, região 8q24 e *WNT11*.

**2- Metodologia/procedimentos:** Regiões polimórficas serão analisadas pelo método de genotipagem por discriminação alélica com sondas fluorescentes em amostras de DNA de pacientes com carcinoma espinocelular bucal e de indivíduos sem histórico de câncer, FL/PNS ou qualquer malformação congênita, que serão utilizados como grupo controle. A ancestralidade será determinada pela análise de um painel de 40 polimorfismos de inserção-deleção (INDELs).

**3- Justificativa:** A avaliação destes polimorfismos poderá contribuir para uma melhor compreensão dos fatores genéticos de risco entre essas duas condições (câncer bucal e FL/PNS) numa população brasileira.

**4- Benefícios:** Contribuir para uma melhor compreensão dos fatores genéticos de risco entre essas duas condições (câncer bucal e FL/PNS) numa população brasileira.

**5- Desconfortos e riscos:** Não se aplica.

**6- Danos:** Não se aplica.

**7- Metodologia/procedimentos alternativos disponíveis:** Não se aplica.

**8- Confidencialidade das informações:** Todas as informações cedidas serão mantidas em sigilo profissional.

**9- Compensação/indenização:** Não havendo riscos aos indivíduos envolvidos.

**10- Outras informações pertinentes:**

**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

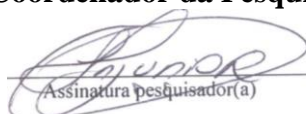
Assinatura do participante

Data\_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Coordenador da Pesquisa**



Assinatura pesquisador(a)

**Hercílio Martelli Júnior**

Rua Olegário da Silveira, 125, Ap 201. Montes Claros – Minas Gerais – 39400-090.  
38-3224-8379

APÊNDICE B: Instrumento de coleta de dados - *Pesquisa relacionada ao câncer bucal.*

<b>1.DADOS GERAIS:</b>	
1.1 Nome:	1.2 Prontuário:
1.3 Sexo: ( ) M ( ) F	
1.4 Data de nascimento: ___/___/___	1.5 Idade: _____ anos
1.6 Município de origem:	
1.7 Local de atendimento:	
1.8 Cor da pele: ( ) Leucoderma ( ) Melanoderma ( ) Feoderma ( ) Xantoderma	
1.9 ( ) Destro ( ) Canhoto	
1.10 Localização da lesão oral:	
1.11 Resultado do diagnóstico histopatológico do câncer oral:	
1.12 Estadiamento:	
1.13 Presença de metástase ( ) sim ( ) não	
1.14 Idade do paciente no momento do diagnóstico da doença: _____ anos	
<b>2. ANÁLISE DA PROPORÇÃO 2D:4D</b>	
<b>2- Relação 2D:4D</b>	
<b>MÃO DIREITA</b>	
<b>2.1 Primeira medida:</b> Comprimento do dedo indicador: Comprimento de dedo anelar: Razão 2D:_____:____cm 4D	<b>2.2 Segunda medida:</b> Comprimento do dedo indicador:_____ Comprimento de dedo anelar:_____ Razão 2D:_____:____cm 4D
<b>2.3 Média das razões R2D:4D:</b>	
<b>Relação R2D:4D:</b> ( ) dedo indicador maior que o dedo anelar ( ) dedo indicador menor que o dedo anelar ( ) dedo indicador de mesmo comprimento que dedo anelar	
<b>3- Relação 2D:4D</b>	
<b>MÃO ESQUERDA</b>	
<b>3.1 Primeira medida:</b> Comprimento do dedo indicador: Comprimento de dedo anelar: Razão 2D:_____:____cm 4D	<b>3.2 Segunda medida:</b> Comprimento do dedo indicador:_____ Comprimento de dedo anelar:_____ Razão 2D:_____:____cm 4D
<b>3.3 Média das razões L2D:4D:</b>	
<b>Relação L2D:4D:</b> ( ) dedo indicador maior que o dedo anelar ( ) dedo indicador menor que o dedo anelar ( ) dedo indicador de mesmo comprimento que dedo anelar	
<b>4. QUESTIONÁRIO</b>	
4.1 Você sofreu alguma fratura nos dedos anular ou indicador? ( )Sim ( )Não	
4.2Exposição ao HPV-16 ( ) sim ( ) não	
4.3 Você tem/já teve alguma doença hormonal? ( )Sim Tipo: ( )Não ( )Não sabe informar	
<b>4.4 Você faz uso de tabaco (fuma)?</b> ( )Não	



<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Raramente, <input type="checkbox"/> 1 dia/sem, <input type="checkbox"/> 2 a 3 dias /sem, <input type="checkbox"/> Todo dia ou quase todo dia Número de Cigarros/Dia _____ Tipo de cigarro: <input type="checkbox"/> Industrializado <input type="checkbox"/> Palha <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> Ex-fumante - Parou há _____ anos	
<b>4.5 Você faz uso de álcool?</b> <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Ex-etilista - Parou há _____ anos Tipo de bebida: Qual a quantidade que você bebe (bebia) por ocasião ml/l : _____	
<b>4.6 Uso de prótese dentária</b> <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim Tipo: <input type="checkbox"/> fixa <input type="checkbox"/> móvel <input type="checkbox"/> parcial <input type="checkbox"/> total	
<b>4.7 Sócio-econômico:</b>	
<b>4.7.1 Escolaridade (em anos)</b> <input type="checkbox"/> Analfabeto <input type="checkbox"/> 1-8 anos <input type="checkbox"/> 9-11 <input type="checkbox"/> > 11	
<b>4.7.2 Renda familiar:</b> _____ reais Número de pessoas residente no domicílio: _____ pessoas Calcular renda per capita:	
<b>CA DE BOCA X FLP/NS E AUSÊNCIA DENTAL</b>	
<b>5. Tem histórico de Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica (FL/PNS) na família?</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe informar	
5.1 Se tem histórico positivo para FL/PNS, especifique o grau de parentesco. <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Irmão(a) <input type="checkbox"/> Filho(a) <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> Não sabe informar	
<b>5.2 Tipo de FL/PNS:</b> <input type="checkbox"/> Fissura labial unilateral <input type="checkbox"/> Fissura labial bilateral <input type="checkbox"/> Fissura labiopalatina unilateral <input type="checkbox"/> Fissura labiopalatina bilateral <input type="checkbox"/> Fissura palatina <input type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/> Não sabe informar	
<b>5.3 Presença de ausência(s) dental(is):</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Se sim: 0. <input type="checkbox"/> ICS <input type="checkbox"/> ICI 1. <input type="checkbox"/> ILS <input type="checkbox"/> ILI 2. <input type="checkbox"/> CS <input type="checkbox"/> CI 3. <input type="checkbox"/> 1° PMS <input type="checkbox"/> 1° PMI	4. <input type="checkbox"/> 2° PMS <input type="checkbox"/> 2° PMI 5. <input type="checkbox"/> 1° MS <input type="checkbox"/> 1° MI 6. <input type="checkbox"/> 2° MS <input type="checkbox"/> 2° MI <input type="checkbox"/> Não se aplica; <input type="checkbox"/> Não sabe informar
<b>Raio X:</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Se sim: <input type="checkbox"/> Ausência de germe <input type="checkbox"/> Dente incluso - Qual dente? _____	
<b>Material coletado:</b>	

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Informado- *Pesquisa de câncer de mama.*

**Título do Projeto: Análise de polimorfismos em genes associados às fissuras do lábio ou palato não sindrômicas em pacientes com câncer de mama: estudo caso-controle.**

Fissuras do lábio ou palato não sindrômicas (FL/PNS) representam as anomalias congênitas mais comuns da face, correspondendo a aproximadamente 65% de todas as malformações da região craniofacial. A etiologia das FL/PNS é multifatorial com a participação de fatores genéticos e ambientais, sendo os fatores etiológicos envolvidos nesta condição ainda pouco compreendidos. Câncer constitui um conjunto de doenças multifatoriais com participação genética e ambiental. Atualmente, tem sido discutida a associação entre câncer e FL/PNS, já que estudos epidemiológicos tem indicado uma maior suscetibilidade ao câncer em indivíduos afetados pelas FL/PNS, inclusive câncer de mama. Assim, é possível que genes envolvidos em diversos processos biológicos importantes como a embriogênese craniofacial estejam relacionados à carcinogênese. O objetivo deste estudo será identificar polimorfismos em genes previamente associados às FL/PNS em pacientes com câncer de mama, em uma abordagem do tipo caso-controle.

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. Em se tratando de pesquisa a ser realizada com menores de idade, responsabilizarei pela divulgação dos dados.

Nome do participante

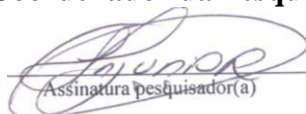
Assinatura do participante

Data \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Coordenador da Pesquisa**



Assinatura pesquisador(a)

**Hercílio Martelli Júnior**

Rua Olegário da Silveira, 125, Ap 201. Montes Claros – Minas Gerais – 39400-090.  
38-3224-8379

APÊNDICE D – Instrumento de coleta de dados - *Pesquisa relacionada ao câncer de mama.*

**Prezado Senhor (a), com o objetivo de determinar a frequência de FL/PNS em familiares de pacientes (primeiro grau: pai, mãe e filho) sobreviventes ao câncer de mama, a Universidade Estadual de Montes Claros está realizando a pesquisa intitulada “Análise da Ocorrência de Não-Sindrômica em Parentes de Sobreviventes ao Câncer de Mama”. O senhor (a) pode participar respondendo a este questionário que dura cerca de 10 minutos? SIM\_\_ ou NÃO\_\_**

1. Iniciais do nome:	_____	Prontuário:
2. Sexo:	1. Masculino <input type="checkbox"/> ; 2. Feminino <input type="checkbox"/> .	Data:
3. Data Nascimento:	____/____/____	( ) anos
4. Nacionalidade:		
5. Naturalidade:		
6. Cor da pele:	1. Ascendência Européia <input type="checkbox"/> ; 2. Ascendência Africana <input type="checkbox"/> ; 3. Ascendência Japonesa	
7. Cosanguidade na família:	1. Positiva <input type="checkbox"/> , 2. Negativa <input type="checkbox"/>	
8. Resultado do diagnóstico histopatológico do câncer de mama.	1. Carcinoma mamário. Qual tipo?_____.	

9. Tem histórico de Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica (FL/PNS) na família?

1. Sim ; 2. Não ; 3. Não sabe informar .

Especifique:

9.2a. Grau de parentesco: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_.

9.2b. Tipo de FL/PNS:

9.3a. Grau de parentesco: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_.

9.3b. Tipo de FL/PNS:

9.4a. Grau de parentesco: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_.

9.4b. Tipo de FL/PNS:

9.5a. Grau de parentesco: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_.

9.5b. Tipo de FL/PNS:


9.6a. Grau de parentesco: \_\_\_\_\_  
FL/PNS: \_\_\_\_\_.

9.6b. Tipo de


## ANEXO

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa do projeto 1:

Projeto de pesquisa “Análise de polimorfismos em genes associados às fissuras de lábio e/ou palato em pacientes com carcinoma de células escamosas de boca: estudo caso-controle pareado com ancestralidade”.



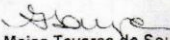
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**PARECER CONSUBSTANCIADO**

Montes Claros, 18 de dezembro de 2011.  
Processo Nº 3247  
Título do Projeto: **Análise da ocorrência de fissura labial e/ou palatina não síndrômica em parentes de pacientes com câncer de boca.**  
**Equipe técnica:** Hercílio Martelli Júnior (Coordenador), Lívia Máris Ribeiro Paranaíba, Mário Sérgio Oliveira Swerts, Daniella Reis Barbosa Martelli e Fábio de Abreu Alves  
**Relatora:** Profª Drª Maisa Tavares de Souza Leite.  
**Histórico:** O projeto foi encaminhado pelo Coordenador do PPGCS ao Comitê de Ética em Pesquisa da Unimontes no dia 01 de dezembro de 2011, sendo analisado em reunião ordinária no dia 18 de dezembro de 2011.  
**Mérito:**  
Trata-se de estudo quantitativo, transversal, comparativo e com caso-controle com o objetivo de determinar a frequência de FL/PNS em familiares de pacientes (primeiro grau: pai, mãe e filho) com histórico de câncer de boca, a fim de melhor elucidar a relação entre essa neoplasia maligna e as FL/PNS. Serão entrevistados 200 pacientes com histórico de câncer de boca (grupo caso) e 300 indivíduos sem histórico pessoal e familiar de câncer de boca ou qualquer outra neoplasia maligna em parentes de primeiro grau (grupo controle). Após aplicação dos questionários, as informações coletadas serão transferidas para um banco de dados construído no programa estatístico SPSS versão 18.0. As comparações entre os parentes dos sobreviventes ao câncer de boca e os pacientes do grupo “controle” quanto à presença de FL/PNS serão realizadas por meio do teste de qui-quadrado para variáveis categóricas e teste *t student* para as variáveis contínuas. O nível de significância adotado será de 0.05. Será realizada regressão logística condicional para estimar a razão de chances (OR) que permitirá avaliar a magnitude da associação entre o câncer de boca e as formas de FL/PNS. A pesquisa poderá contribuir para a melhor compreensão da relação entre essas duas alterações de relevante importância em saúde pública, assim como permitir perspectivas futuras para estudos genéticos na elucidação da patogênese das FL/Ps e do câncer de boca. O projeto apresenta Termo de Consentimento Institucional de acordo os aspectos éticos que estipula normas éticas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos (Resolução nº 196 de 10/10/96 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde) e não apresenta risco, desconforto mínimo e nenhum procedimento invasivo, não havendo nenhum tipo de dano.

**Parecer**  
O Comitê de Ética da Unimontes analisou o processo 3247 e entende que o mesmo está completo e dentro das normas do Comitê e das Resoluções do Conselho Nacional da Saúde/Ministério da Saúde. Sendo assim, somos pela **APROVAÇÃO**.

  
Prof. Maisa Tavares de Souza Leite  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Unimontes

## ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa do projeto 2:

Projeto de pesquisa “Análise de polimorfismos em genes associados às fissuras do lábio ou palato não sindrômicas em pacientes com câncer de mama: estudo caso-controle”.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
MONTES CLAROS -  
UNIMONTES



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Análise de polimorfismos em genes associados às fissuras do lábio ou palato não sindrômicas em pacientes com câncer de mama

**Pesquisador:** Edmilson Martins de Freitas

**Área Temática:** Genética Humana:  
(Trata-se de pesquisa em genética do comportamento.);

**Versão:** 3

**CAAE:** 44704114.2.0000.5146

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

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.145.493

**Data da Relatoria:** 10/07/2015

**Apresentação do Projeto:**

Fissuras do lábio ou palato não sindrômicas (FL/PNS) representam anomalias congênitas comuns da região craniofacial. Fatores etiológicos envolvidos nessa condição ainda são poucos compreendidos. Atualmente, se discute a associação entre câncer e FL/PNS, já que estudos epidemiológicos indicam uma maior suscetibilidade ao câncer em indivíduos afetados pelas FL/PNS, inclusive câncer de mama.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar polimorfismos em genes associados às fissuras do lábio ou palato não sindrômicas (FL/PNS) em uma abordagem do tipo caso-controle.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O desconforto é considerado mínimo, uma vez que o participante realizará bochecho com solução salina em concentração apropriada para coletar a saliva.

Como benefícios foram previstos: qualificação de recursos humanos estudantes de iniciação científica e de pós-graduação e melhor compreensão de possíveis associações entre FL/PNS e câncer.

**Endereço:** Av. Dr. Rui Braga s/n - Camp. Univers. Prof. Darcy Rib  
**Bairro:** Vila Mauricéia **CEP:** 39.401-069  
**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: 1.145.493

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa do tipo caso-controle importante na área de câncer de mama.

**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.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Sim

**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.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

MONTES CLAROS, 10 de Julho de 2015

Assinado por:  
SIMONE DE MELO COSTA  
(Coordenador)

*Profª Dna. Simone de Melo Costa*  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisas da Unimontes  
Mesa USP 11.5

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 C – Normas da Revista da publicação do artigo.



## ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.3
• Guide for Authors	p.4



#### DESCRIPTION

*Archives of Oral Biology* operates a web-based submission and review system. Please register at <http://ees.elsevier.com/soob> to submit a paper.

*Archives of Oral Biology* is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality in the **oral** and **craniofacial** sciences. The journal is particularly interested in research which advances knowledge in the mechanisms of **craniofacial development** and **disease**, including: **Cell and molecular biology Molecular genetics Immunology Pathogenesis Cellular microbiology Embryology Syndromology Forensic dentistry** The aim is to be inclusive and multidisciplinary and papers are also welcome in the fields of structure and function of craniofacial tissues over the whole range of vertebrates including studies concerned with palaeontology and comparative anatomy. *Archives of Oral Biology* will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

#### AUDIENCE

Oral biologists, physiologists, anatomists, pathologists.

#### IMPACT FACTOR

2017: 2.050 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018



**Editors-in-Chief:****Professor G B Proctor, London, UK****Professor S W Cadden, Dundee, Scotland**

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- salivary biology
- mastication and swallowing
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will consider clinical papers only where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#)

**Types of Contribution**

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed.

***Page charges***

This journal has no page charges.

**Submission checklist**

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check all relevant sections 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* (where applicable)

*Highlights* (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)
- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- 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](#)



## Before You Begin

### Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### Studies in humans and animals

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. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms **sex and genders** should be used correctly.

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. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### **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 competing interests 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.

### **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 is likely to be checked by the originality detection service CrossCheck.

### ***Preprints***

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to

differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

### **Contributors**

If there are four or more authors, then each is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that "All authors have read and 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.

### **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 gold 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 gold 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.

### ***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.

### *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 gold 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.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

### *Gold open access*

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold 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 gold 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 gold open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://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 Researcher Academy*

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

### *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.

### **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.



## Preparation

### Peer review

This journal operates a single 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.](#)

### *Use of word processing software*

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To minimize unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### Article structure

#### *Manuscript Structure*

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

#### *Introduction*

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

### *Materials and Methods*

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

### *Results or Findings*

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

### **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.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

### **Structured abstract**

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

### ***Highlights***

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British 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**

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DEAE-cellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. Chemical

symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible.

### ***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.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

### ***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.

### **Bacterial nomenclature**

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

### **Artwork**

### *Image manipulation*

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

### *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.

*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.

**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.

*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. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes.](#)

### ***Reference style***

*Text:* Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be [ordered online](#) or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

*List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003).  
<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13 March 2003.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

## Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

## 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](#).



### **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 gold 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.

### Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.:

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- n values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply n=50 when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that  $P=0.000$  (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is  $P<0.0005$ .



### Author Inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).