Joanna Goes Castro Meira

Estudo clínico e molecular em pacientes com fissuras orais para avaliação do efeito fenotípico de variantes do IRF6 e estimativa da contribuição genética nas fissuras palatinas.

Clinical and molecular studies in patients with oral clefts to assess the phenotypic effect of IRF6 variants and the genetic contribution to cleft palate.

São Paulo

2014

Joanna Goes Castro Meira

Estudo clínico e molecular em pacientes com fissuras orais para avaliação do efeito fenotípico de variantes do IRF6 e estimativa da contribuição genética nas fissuras palatinas.

Clinical and molecular studies in patients with oral clefts to assess the phenotypic effect of IRF6 variants and the genetic contribution to cleft palate.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador(a): Maria Rita dos Santos e Passos Bueno

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Meira, Joanna Goes Castro
Estudo clínico e molecular em pacientes com fissuras orais para avaliação do efeito fenotípico de variantes do *IRF6* e estimativa da contribuição genética nas fissuras palatinas.
131 f.
Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Fissuras labiais e palatinas 2. Síndrome de Van der Woude 3. *IRF6* 4. Herdabilidade. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Dedicatória

Aos pacientes, que tornaram este trabalho uma realidade, e aos amigos que fiz em um lugar chamado *Lab 200.*

Epígrafe

"Compositor de destinos
Tambor de todos os rítmos
Tempo tempo tempo tempo
Entro num acordo contigo
Tempo tempo tempo tempo...

Por seres tão inventivo
E pareceres contínuo
Tempo tempo tempo tempo
És um dos deuses mais lindos
Tempo tempo tempo tempo..."

Caetano Veloso, *Oração ao tempo*

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelo amor e incentivo constantes, que sempre torcem pelos meus projetos.

A Julio, meu marido e companheiro de estudos, pela paciência e carinho e por compartilhar os segredos do Excel nos momentos mais difíceis.

A meus irmãos, pelas experiências trocadas e por me presentearem com meus sobrinhos e afilhados.

Ao meus amigos, por encantarem minha vida e tornarem a jornada do Mestrado mais leve.

A TODOS os amigos do Lab 200 por me ajudarem diariamente, desde o meu primeiro dia de contato com Genética Molecular. Foi um prazer e um orgulho poder compartilhar meus dias com vocês.

Às meninas do Lab 200 que moram no meu coração. Aos meninos do Lab 200 que são amigos maravilhosos.

A Kátia Rocha, Meire Aguena e Monize por me ensinarem tudo sobre seqüenciamento de DNA.

A meu anjo da guarda.

E finalmente gostaria de agradecer à Prof Maria Rita Passos-Bueno, a melhor orientadora que eu poderia conhecer, pela confiança e apoio nas tarefas mais impossíveis.

Notas

Esta dissertação de mestrado compreende um trabalho desenvolvido durante os anos de 2011 a 2013 no Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH/IB-USP).

A apresentação do trabalho seguiu o modelo de divisão em capítulos/artigo, modelo este aceito atualmente pelos programas de pós-graduação do Instituto de Biociências. Desta maneira, os artigos estão redigidos em inglês, por motivos referentes à publicação. As seções referentes à Introdução e Discussão gerais estão escritas em português, conforme especificado pelas regras deste Instituto.

As referências bibliográficas referentes a cada um dos artigos estão relacionadas ao final dos mesmos. Já as referências que constam na Introdução e Discussão gerais encontram-se ao final na dissertação.

Embora o novo acordo ortográfico da língua portuguesa esteja em vigência, sua obrigatoriedade será apenas em 2016. Sendo assim, optei por utilizar a regra antiga.

Índice

Introdução Geral e Objetivos		01
1.	Introdução Geral	01
1.1.	Fissuras Orofaciais	01
1.2.	Fissuras labiais e palatinas	01
1.2.1.	Embriologia das fissuras labiais e palatinas	04
1.3.	Fissuras labiais com ou sem fissura palatina (FL±P)	06
1.3.1.	Epidemiologia das FL±P	06
1.3.2.	Etiologia das FL±P sindrômicas	06
1.3.3.	Etiologia das FL±P não sindrômicas (FL±PNS)	10
1.3.3.1.	Fatores genéticos associados às FL±PNS	11
1.3.3.2.	Fatores ambientais associados às FL±PNS	13
1.4.	Fissuras palatinas (FP)	14
1.4.1.	Epidemiologia das FP	14
1.4.2.	Etiologia das FP sindrômicas (FP)	14
1.4.3.	Etiologia das FP não sindrômicas (FPNS)	17
1.4.3.1.	Fatores genéticos associados às FPNS	18
1.4.3.2.	Fatores ambientais associados às FPNS	18
2.	**Justificativa e Objetivos**	20
Capítulo 1.	**Identificação e avaliação do impacto fenotípico de variantes no *IRF6* em famílias com fissuras orais não sindrômicas**	22
Capítulo 2.	**Análise da contribuição genética nas fissuras palatinas não sindrômicas em uma população brasileira**	97
Discussão Geral e Conclusões		116
Resumo		120
Abstract		122
Referências Bibliográficas		124

Introdução Geral e Objetivos

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. FISSURAS OROFACIAIS

As fissuras orofaciais decorrem de uma falha no desenvolvimento facial e palatino embrionário que resultam em uma série de anomalias na estrutura facial. Essas anomalias congênitas têm uma ampla variedade de apresentações anatômicas que podem acometer toda a face, sendo subdivididas em "atípicas" ou "típicas". As fissuras atípicas são mais raras e incluem as fisssuras medianas ou oblíquas. As fissuras típicas são mais freqüentes e incluem as fissuras labiais ou palatinas (MANGOLD *et al.* , 2011). Diversos esquemas de classificação são utilizados para descrever as fissuras orofaciais. Esses esquemas podem basear-se na descrição anatômica, como a classificação de Tessier ou no ponto de vista embriológico, como a classificação de van der Meulen (EPPLEY *et al.* , 2005; TESSIER, 1976; VAN DER MEULEN *et al.* , 1983). Nas diversas classificações, os termos fissuras labiais ou fissuras palatinas devem restringir-se aos defeitos envolvendo os palatos primário e secundário, como detalhado a seguir.

1.2. FISSURAS LABIAIS E PALATINAS

As fissuras labiais e palatinas fazem parte do grupo das fissuras orais e são malformações congênitas muito comuns, ficando atrás, em freqüência, apenas dos pés tortos congênitos, quando se avaliam todas as malformações congênitas maiores (STRONG & BUCKMILLER, 2001). Apesar da variação devido a fatores socioeconômicos e étnicos, a prevalência mundial das fissuras labiais e palatinas é frequentemente citada como 1:700 nascidos vivos, no entanto, os diferentes métodos de apuração podem levar a flutuações nas taxas de prevalência (MOSSEY & CASTILLA, 2001; MANGOLD *et al.* , 2009).

As fissuras apresentam grande interferência no prognóstico dos pacientes, podendo afetar a fala, audição, cognição e estética, comprometendo a saúde e integração social desses indivíduos. As crianças afetadas apresentam maior morbidade e mortalidade necessitando de acompanhamento multidisciplinar. O tratamento inclui

múltiplas cirurgias desde o nascimento até a idade adulta, terapia fonoaudiológica, odontológica e psicológica, acompanhamento com geneticista e otorrinolaringologista. Além disso, embora a reabilitação seja possível, estes defeitos impõem uma sobrecarga para o indivíduo, sua família e sociedade com custos substanciais para o sistema de saúde e consequências psicológicas consideráveis para os envolvidos (MOSSEY, 2009; BENDER, 2000). Nos Estados Unidos, por exemplo, o custo do tratamento completo de um único paciente tem sido estimado em US$100.000,00 (Centers for Disease Control and Prevention, http://www.cdc.gov) consistindo em um sério problema de saúde pública.

As fissuras labiais e palatinas representam um grupo heterogêneo de desordens que afetam os lábios e a cavidade oral e resultam, basicamente, da falha na fusão dos processos maxilares ou placas palatinas, que ocorrem entre a 4ª e 12ª semanas da embriogênese humana (MOSSEY *et al.* , 2009). Estas malformações apresentam uma ampla expressividade clínica, podendo acometer o lábio e palato de maneiras variadas. Em relação à classificação anatômica, uma das referências mais utilizadas, principalmente no Brasil, é a Classificação de Spina e colaboradores (1972), que leva em consideração a embriologia das estruturas faciais divididas em palato primário e secundário, e sua convergência em torno do forâmen incisivo, podendo ser classificadas em fissuras pré-foramen incisivo (fissuras labiais), fissuras pós-foramen incisivo (fissuras palatinas), fissuras transforamen incisivo (fissuras lábio-palatinas) (Figura 1):

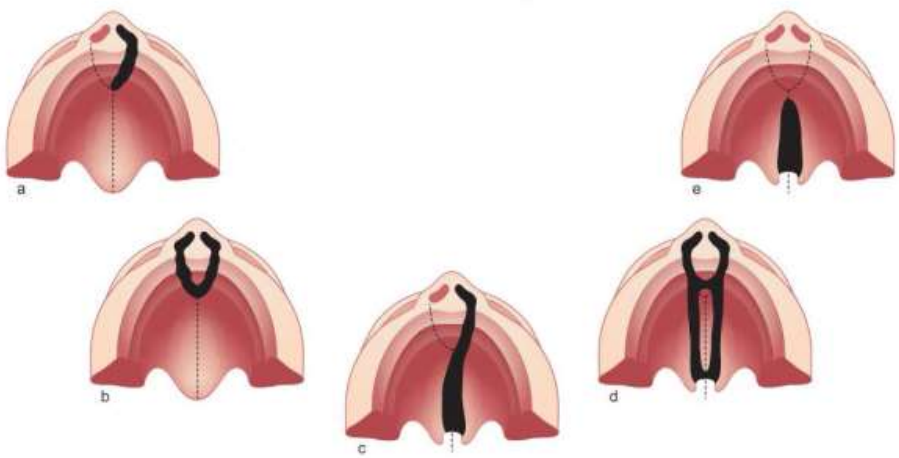


Figura 1: Desenho esquemático do lábio e palato, representando os tipos mais comuns de fissuras. a) Fissura labial unilateral com envolvimento alveolar (ou fissura pré-foramen incisivo

unilateral); b) Fissura labial bilateral com envolvimento alveolar (ou fissura pré-foramen incisivo bilateral); c) Fissura labial unilateral associada com fissura palatina completa (ou fissura transforamen incisivo unilateral); d) Fissura labial bilateral com fissura palatina completa (ou fissura transforamen incisivo bilateral); e) fissura palatina (ou fissura pós-foramen incisivo). (Modificado de BRITO et al, 2012).

Existem também microformas mais leves, que se manifestam como uma cicatriz labial presente ao nascimento, uma descontinuidade do músculo orbicular do lábio (detectada através de exame ultrassonográfico, WEINBERG *et al.* , 2008), uma fissura palatina submucosa (união imperfeita do músculo no véu palatino, mas com superfície da mucosa intacta; GORLIN *et al.* , 2001), úvula bífida ou agenesia de úvula.

As fissura labiais e palatinas, são geralmente divididas em dois subgrupos: fissuras labiais com ou sem fissura palatina (FL±P) e fissuras apenas de palato (FP) representando um grupo heterogêneo de desordens que afetam os lábios e a cavidade oral (MOSSEY *et al.* , 2009). Essas entidades são consideradas distintas com base nas diferenças embriológicas, epidemiológicas e genéticas (KERRIGAN et al, 2000; JIANG et al, 2006; DIXON *et al.* , 2011) e, geralmente, há segregação do mesmo subtipo de fissura em uma família (KOT & KRUK-JEROMINI, 2007). Recentemente, sugeriu-se que há um mecanismo distinto também para as fissuras apenas de lábio (HARVILLE et al, 2005).

Entre os geneticistas, as FL±P e FP também são geralmente categorizadas em *sindrômicas* e *não sindrômicas*, sendo esta a classificação adotada neste projeto. São consideradas não sindrômicas as fissuras que ocorrem como a única malformação no indivíduo, o que representa 70% dos casos de FL±P e 50% dos casos de FP. São consideradas sindrômicas as fissuras que ocorrem associadas a outras malformações ou deficiências cognitivas, sendo representadas por 30% dos casos de FL±P e 50 % dos casos de FP (STANIER & MOORE, 2004; JUGESSUR et al, 2005). Entretanto, em algumas formas sindrômicas de fissuras, ambas as entidades, FL±P e FP, podem segregar na mesma família (NEILSON *et al.* , 2002; KOT & KRUK-JERONIMI, 2007; RUTLEDGE *et al.* , 2010).

Alterações gênicas, cromossômicas e ainda fatores teratogênicos podem estar relacionados à etiologia das fissuras sindrômicas. Nas fissuras sindrômicas com padrão de herança mendeliano, essas podem ser autossômicas dominantes ou recessivas ou ligadas ao X. Por outro lado, os mecanismos etiológicos causativos das FL±P ou FP não

sindrômicas (NS) ainda são muito pouco conhecidos, porém acredita-se que resultem de uma combinação de fatores genéticos e ambientais (CHRISTENSEN & MITCHELL, 1996; SIVERTSEN et al, 2008; NORDSTROM et al, 1996; GROSEN et al, 2011).

Para as fissuras não sindrômicas, o padrão de herança mais aceito é o multifatorial com efeito de limiar, isto é, a manifestação da doença resulta da interação entre diversos fatores genéticos e ambientais, de modo que ao atingir uma determinada concentração desses fatores de risco, ocorre a manifestação da doença (GROSEN *et al.* , 2010; RAHIMOV *et al.* , 2008).

1.2.1. Embriologia das fissuras labiais e palatinas

A embriologia das FL±P e FP será abordada em conjunto nesta seção.

O desenvolvimento da cabeça e da face é um evento embriológico complexo coordenado por uma rede de fatores de transcrição e moléculas sinalizadoras e proteínas responsáveis por interações celulares. Distúrbios nesta cascata podem resultar em fissuras faciais com defeitos de fusão e formação das estruturas apropriadas (STANIER & MOORE, 2004). Em amostras de modelos animais, como camundongos, vários fatores genéticos e ambientais interagem para determinar qual o estágio de desenvolvimento no qual as placas palatinas movem-se das posições laterais para o plano horizontal sobre a língua. Se este processo não ocorrer em um determinado estágio gestacional, as placas palatinas não serão capazes de se alcançarem para fundirem-se, resultando na fissura (FRASER, 1970).

O desenvolvimento embrionário do lábio e palato em humanos, inicia-se por volta da quarta semana gestacional. A descrição destes eventos pode ser acompanhada através da representação esquemática na Figura 2. Ao redor da quarta semana de desenvolvimento embrionário, ocorre o desenvolvimento da proeminência frontonasal, dos processos maxilares, dos processos mandibulares pareados e a cavidade oral primitiva. Ao redor da quinta semana, as fossas nasais são formadas, o que leva à formação dos processos nasais pareados mediais e laterais. Ao fim da sexta semana os processos mediais nasais se fundem com os processos maxilares para a formação do lábio superior e palato primário. Os processos laterais nasais formam a ala nasal. De forma similar, os processos mandibulares se fundem para formar a maxila inferior e durante a sexta semana de embriogênese, o palato secundário se desenvolve com o crescimento bilateral dos processos maxilares, que crescem verticalmente ao lado da

língua. Em seqüência, as lâminas palatinas se elevam a uma posição horizontal sobre a língua, entrando em contato uma com a outra e começando a fusão. Finalmente, ocorre a fusão das lâminas palatinas, dividindo o espaço oronasal em cavidades oral e nasal separadas (Figura 2) (DIXON *et al.* , 2011).

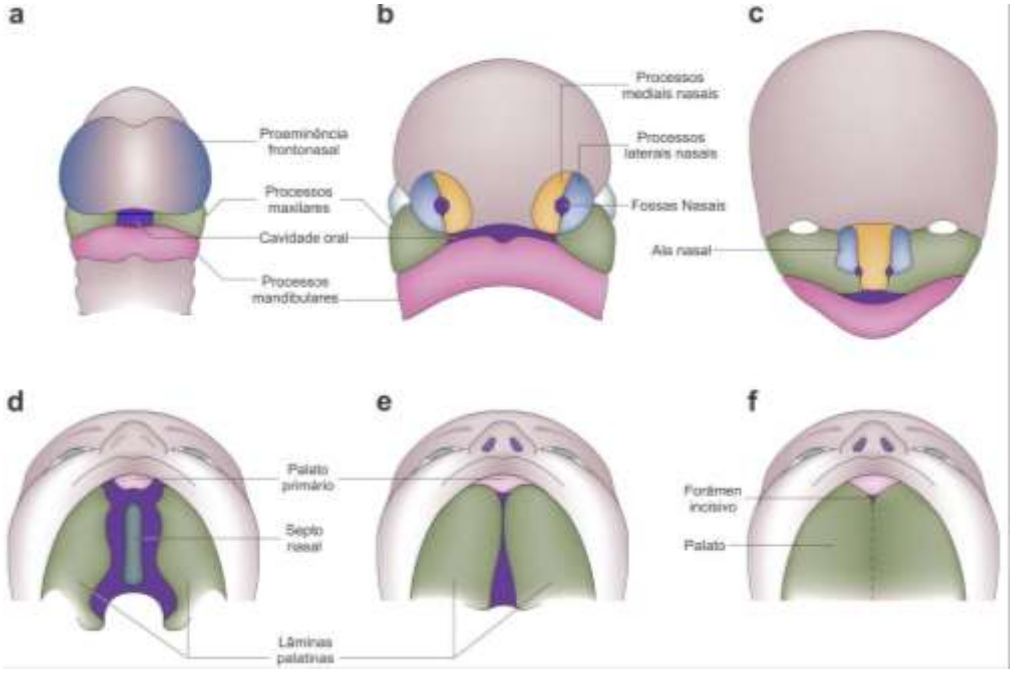


Figura 2: Desenho esquemático do desenvolvimento do lábio e palato em humanos. Cada figura corresponde a uma fase do desenvolvimento embrionário humano. a) 4ª semana: desenvolvimento da proeminência frontonasal, os processos maxilares, os processos mandibulares pareados e a cavidade oral primitiva ao centro; b) 5ª semana: formação das fossas nasais e dos processos nasais pareados mediais e laterais; c) 6ª semana: fusão dos processos mediais nasais se com processos maxilares. Formação do lábio superior e palato primário. Os processos laterais nasais formam a ala nasal. Fusão dos processos mandibulares para formar a maxila inferior; d) Ainda na 6ª semana: desenvolvimento do palato secundário com o crescimento bilateral dos processos maxilares; e) Em seqüência, elevação e início da fusão das lâminas palatinas; f) Por fim, ocorre a fusão das lâminas palatinas, dividindo o espaço oronasal em cavidades oral e nasal separadas (Mod. de DIXON *et al.* , 2011).

Por volta do 35° dia gestacional em humanos, o lábio normalmente está fundido, porém uma falha nesse fechamento pode comprometer a fusão das placas palatinas que só se unem na oitava ou nona semana, por isso a fissura palatina é uma associação

freqüente com lábio leporino. Cerca de 50% dos pacientes com fissura labial apresentam também fissura palatina, que parece ser um efeito secundário resultante do defeito da fusão das proeminências faciais que precede a formação do palato (STANIER & MOORE, 2004).

Outras alterações subseqüentes são defeitos no desenvolvimento dentário e crescimento incompleto da asa do nariz do lado da fissura. Entre as conseqüências terciárias, podem ocorrer problemas na fala, incompetência palatina e perda auditiva condutiva (JONES *et al.* , 1998).

Este processo pode falhar completamente ou ser interrompido em qualquer estágio produzindo a variedade de fissuras completas, incompletas, unilaterais ou bilaterais vistas clinicamente (SOMMERLAD *et al.*,1994). Processos celulares essenciais para a morfogênese apropriada do lábio e palato, como a proliferação, diferenciação e apoptose, são regulados por vias de sinalização moleculares complexas e, portanto, os fatores genéticos e ambientais responsáveis pela desregulação dessas vias são objeto de intensa investigação, uma vez que é esperado que a sua compreensão acelere o desenvolvimento de medidas preventivas para esse defeito.

A seguir, será revisada a epidemiologia e a etiologia das FL±P e FP separadamente.

1.3. FISSURAS LABIAIS COM OU SEM FISSURA PALATINA (FL±P):

1.3.1. Epidemiologia das FL±P:

Inúmeros estudos epidemiológicos sobre a incidência das FL±P foram realizados em diversos países. As FL±P ocorrem em uma ampla distribuição geográfica, com uma incidência média de 1/700 nascimentos (MANGOLD et al, 2009), contudo, a incidência varia entre populações de diferentes ancestralidades: índios americanos têm uma incidência de FL±P de 3,6:1000 nativivos, seguidos por japoneses (2,1:1000), chineses (1,7:1000) e caucasianos (1/1000). Os afro-americanos apresentam a menor incidência de FL±P (0,3:1000 neonatos) (BENDER, 2000). No Brasil, as estimativas de FL±P variam de 0,6 a 1,54:1000 nascimentos. Este valor pode variar a depender do componente étnico e dos fatores socioeconômicos, os quais ainda são pouco conhecidos (LOFFREDO *et al.* , 2001; MENEGOTTO AND SALZANO, 1991b). Ao considerarmos apenas as FL±PNS, esta incidência é considerada em 1:1000 nascimentos (MANGOLD et al, 2011).

1.3.2. Etiologia das FL±P sindrômicas (FL±P)

De acordo com a base de dados do OMIM (*Online Mendelian Iheritance in Man Database*), foram descritas na literatura mais de 500 síndromes que cursam com FL±P. (maiores informações disponíveis em http://www.omim.org/search?index=clinicalSynopsis&start=1&limit=10&search=Cleft+lip&sort=score+desc&thesaurus=%22cleft+lip%22). Anormalidades cromossômicas e mutações monogênicas são os mecanismos mais comuns das FL±P.

Entre as cromossomopatias, há diversos relatos de casos de aneuploidias relativamente comuns apresentando FL±P como, por exemplo, as trissomias dos cromossomos 13, 18 e 21, além de outras aneuploidias, deleções e duplicações parciais de outros cromossomos que também têm sido associados com esta malformação (GABRIELLI *et al.* , 2009). Segundo banco de dados do software Possum®, essas anomalias já foram descritas fazendo parte de diversas cromossomopatias, como apresentado na Tabela I:

Tabela I. Algumas alterações cromossômicas descritas em síndromes que apresentam a FL±P em seu quadro clínico.

Alteração cromossômica	**Cromossomos envolvidos**
Monossomia	21
Trissomia	9, 13, 18, 21, 22
Trissomia em mosaico	1, 7, 10, 14, 20
Trissomia parcial	1q distal
Tetrasomia	9p
Deleção parcial p	1p (p32-p32.3), 1p36, 3p(p21-p31), 3p, 4p, 6p, 8p, 10p, 12p, 20q
Deleção parcial q	1q(q24-q25), 1q(q21-q25), 1q(q25-q32), 1q(q43-q44), 2q, 4q, 5q, 7q, 9q, 11q, 12q, 18q, 20q, 22q11.2, 22q13
Duplicação parcial p	1p, 3p, 8p23.1, 9p, 10p, 11p, 12p, 16p11.2, 17p, 20p
Duplicação parcial q	1q(q25q32), 2q(q11.1-q13.2), 3q, 4q, 8q, 11q, 13q, 17q, 22q
Inversão	inv dup 22q11
Microtriplicação	11q42.1

Triploidia	3n

Entre as síndromes gênicas, destaca-se a Síndrome de Van der Woude (SVW; MIM 119300) responsável por 2% de todos os casos de fissuras labiais e palatinas FL±P (SCHUTTE *et al.* , 1996; RINTALA & RANTA, 1981). Esta desordem apresenta um padrão de herança autossômico dominante e alta penetrância de 89-99% (BURDICK *et al.* , 1985). A SVW caracteriza-se clinicamente por FL±P ou FP, fossetas no lábio inferior e hipodontia, dentre outras anomalias menos freqüentes (VAN DER WOUDE, 1954). As fossetas em lábios inferiores são as características mais pertinentes da síndrome e estão presentes em aproximadamente 85% dos casos (BURDICK *et al.* , 1985). Devido à sua expressividade variável, em 15% dos casos, os indivíduos apresentam apenas fissura, sem as fossetas, tornando-se indistinguíveis clinicamente dos indivíduos afetados por formas não-sindrômicas (BURDICK *et al.* ; 1985). A prevalência esperada para a SVW pode ser subestimada devido à existência de microformas da apresentação das fossetas labiais que podem não ser identificadas durante o exame clínico ou não relatadas pelos pacientes (ONOFRE *et al.* ,1997; DISSEMOND *et al.* ,2004). Essas fossetas aparecem como depressões no vermelhão do lábio, variando de uma pequena dobra até um trajeto mucoso de 1 a 25 mm de profundidade, formando um saco em fundo cego envolto por glândulas salivares (ZIAI ET AL, 2005; RIZOS & SPIROPOULOS, 2004).

Kondo *et al.* (2002) demonstraram que mutações no gene *IRF6* (*Interferon Regulatory Fator 6*), são responsáveis pela maioria dos casos da SVW. O *IRF6* é um gene de 19Kb e codifica um fator de transcrição de 467 aminoácidos. Localiza-se na região cromossômica 1q32-q41 e pertence a uma família de nove fatores de transcrição que compartilham um domínio de ligação ao DNA alça-volta-alça altamente conservado e um domínio de ligação a proteína menos conservado na região carboxil terminal chamado SMIR (domínio de ligação ao fator regulador de interferon-Smad) (KONDO *et al.* , 2002, MURRAY *et al.* 1990; SCHUTTE *et al.* , 2000). Este gene é formado por 9 exons, sendo que os exons 1, 2 e parte do 9 não são codificantes.

Estudos demonstraram que o *IRF6* é fortemente expresso no ectoderma das prateleiras palatinas antes e durante a formação do palato secundário (Ben *et al.* , 2005; Knight *et al.* , 2006) e que mutações no *IRF6* podem levar à disrupção no desenvolvimento orofacial.

Essas mutações levam à perda de função da proteína codificada pelo *IRF6* e cerca de 80% delas têm sido encontrados nos exons 3, 4, 7 e 9 (DURDA *et al.* , 1993). A proteína *IRF6* parece desempenhar o seu principal efeito durante o desenvolvimento craniofacial embrionário. No entanto, o *IRF6* também parece agir após o nascimento, pois tem sido verificado que crianças com SVW têm uma maior frequência de complicações da ferida operatória após as cirurgias, comparadas às crianças com fissuras não sindrômicas (JONES *ET AL.* , 2010).

Mutações no *IRF6* são responsáveis por aproximadamente 68% dos casos de SVW e prevê-se que essas mutações patogênicas causam a perda da função da proteína *IRF6* (Kondo *et al.* , 2002; de Lima *et al.* , 2009). Existem várias possibilidades para explicar as 32% restantes: presença de grandes deleções que não são detectados pelas estratégias de seqüenciamento de DNA utilizadas; as mutações patogênicas podem estar localizadas nos introns ou as mutações podem estar localizadas em outro gene (de Lima, 2009). É proposto que as mutações no domínio de ligação ao DNA resultam em uma alteração estrutural e uma inativação do fator de transcrição e que as mutações no domínio de ligação à proteína podem alterar a dimerização do fator de transcrição (KONDO *et al.* ,2002; GHASSIBE *et al.* ,2004; ZIAI *et al.* ,2005).

Recentemente, Peyrard-Janvid *et al.* (2014) relataram mutações causadoras de fissuras no gene GRHL3 (localizado no lócus 1p36.11) na família finlandesa descrita por Koillinen *et al.* (2001) e em 7 famílias adicionais com SVW, demonstrando, assim, que GRHL3 é o segundo gene para mutações que levam a SVW. Esses dados demonstraram que as mutações em dois genes, *IRF6* e GRHL3, pode levar a fenótipos quase idênticas de fenda orofacial, confirmando assim a heterogeneidade de locus para esta síndrome.

Mutações no *IRF6* também são causadoras da Síndrome do Pterígio Poplíteo (SPP; MIM 119500), uma desordem alélica à SVW, com herança autossômica dominante que apresenta, além das anomalias faciais típicas da SVW, pterígeo popliteal bilateral (excesso de tecido formando uma membrana na fossa popliteal), sindactilia, anomalias ungueais e genitais. As fissuras são as anomalias faciais mais frequentemente encontradas nessa síndrome, estando presentes em 91 a 97% dos casos, podendo apresentar vários graus de gravidade (KONDO *et al.* , 2002; HAMAMOTO & MATSUMOTO, 1984; GORLIN et al, 1968). Fossetas ou “pits” paramedianos nos lábios inferiores ocorrem em 45-46% dos casos; singnatia (bandas de mucosa intraoral)

ocorrem em 24-46% dos casos, levando à necessidade de correção cirúrgica para permitir a abertura normal da boca e evitar problemas alimentares; aquiloblefarum filiforme ocorre em cerca de 20% dos casos (FROSTER-ISKENIUS, 1990). O pterígium popliteal é encontrado em 89 a 96% dos casos (HAMAMOTO & MATSUMOTO, 1984) e é considerada a característica mais pertinente da síndrome. A maioria das mutações patogênicas causadoras da SPP está localizada no exon 4 do *IRF6*. Há uma forte correlação genótipo-fenótipo associado com SVW e SPP, mas, o mecanismo como as diferentes mutações levam a essas síndromes ainda é incerto (LITTLE et al, 2009).

As mutações *missense* que causam SVW são devido a uma perda completa da função da proteína *IRF6* mutante, afetando tanto a ligação ao DNA quanto à proteína, enquanto que mutações *missense* causando SPP afetam unicamente a capacidade do *IRF6* de se ligar ao DNA. A capacidade de o *IRF6* mutado para se ligar a outras proteínas não é afetada, e, consequentemente, ocorre a formação de complexos de transcrição inativos, caracterizando uma mutação dominante negativa (Kondo de 2002).A maioria dos casos SVW e SPP pode ser diagnosticada pela avaliação clínica, logo, a necessidade de testes genéticos deve ser avaliada em cada caso.

Diversas outras síndromes gênicas já tiveram parte de sua etiologia elucidada e os respectivos mecanismos mutacionais identificados (Tabela II):

Tabela II. Síndromes com FL±P nas quais os alelos patogênicos foram identificados.

Síndrome	**Gene identificado**
Câncer gástrico familial e FL±P	*CDH1*
Displasia Craniofrontonasal	*EFNB1*
Roberts	*ESCO2*
Holoprosencefalia	*GLI2, SHH, SIX, TGIF*
Oro-facial-digital	*GLI3*
Hidroletal	*HYLS1*
Deficiência mental ligada ao X e FL±P	*PHF8*
Gorlin	*PTCH1*
FL±P e displasia ectodérmica	*PVRL1*
Tranquil-óculo-facial	*TFAP2A*
EEC (Ectrodactilia, displasia ectodérmica e fissura); AEC	*TP73L*

(Anquiloblefaron, displasia ectodérmica e fissura)	
Tetra-amelia com FL±P	*WNT3*

Revisão realizada por Dixon *et al.* (2011).

1.3.3. Etiologia das FL±P não sindrômicas (FL±PNS)

As FL±PNS são consideradas desordens complexas, envolvendo componentes genéticos e ambientais com herança do tipo multifatorial. O seu risco de recorrência é calculado de forma empírica, baseado em estudos populacionais, variando de 4% a 10% a depender do o sexo dos propósitos afetados ,número de indivíduos afetados na família e sua relação de parentesco com o propósito, sendo maior para parentes em I grau (3,5%) (HARPER, 2004). O risco também difere com a gravidade do defeito, sendo que em fissura de lábio-palatina unilateral é de 2,5%, aumentando para 4,6% quando se trata de fissura lábio palatina bilateral (GROSEN *et al.* , 2010). No Brasil, o risco de recorrência foi estimado em apenas 2% entre as famílias com um parente em primeiro grau de um indivíduo afetado por FL±PNS (Brito *et al.* , 2011).

Em estudos envolvendo gêmeos, verificou-se que as taxas de concordância para FL±PNS são maiores em gêmeos monozigóticos (40–60%) que em dizigóticos (3–5%) (revisão em JUGESSUR *et al.* , 2009). Além disso, é observada recorrência familiar em 20-30% dos casos e altas estimativas de herdabilidade (LIE et al, 1994; BRITO *et al.* , 2011). Esses dados fortalecem a evidência de um importante componente genético na etiologia desta malformação.

Em casos NS, a identificação de outros indivíduos com fissuras na família deve sempre ser interpretada com cautela. Devido à heterogeneidade genética associada com FL±PNS, uma família com vários indivíduos afetados pode realmente representar a segregação de um distúrbio monogênico, caracterizando uma forma sindrômica, que poderia não ser prontamente reconhecida com base unicamente na avaliação clínica.

1.3.3.1. Fatores genéticos associados às FL±PNS:

Diversas investigações, com diferentes abordagens, têm sido realizadas na tentativa de identificar loci de susceptibilidade para FL±PNS. Diversos loci candidatos surgiram através de estudos de ligação e associação.

Análises ligação levantaram algumas possíveis regiões genômicas candidatas a fatores de suscetibilidade para FL±PNS, como 6p24 -23 (EIBERG et al, 1987; SCAPOLI *et al.* , 2010); 4q21 (BEIRAGHI *et al.* , 1994), 19q13 (STEIN *et al.* , 1995) e 13q33 (RADHAKRISHNA et al, 2006), porém, estes loci não foram satisfatoriamente reprodutíveis em outros estudos (CARINCI *et al.* , 2007; DIXON *et al.* , 2011). Estes dados podem sugerir a existência de um alto grau de heterogeneidade genética.

Outra abordagem utilizada com maior sucesso para identificação de variantes de predisposição a doenças complexas, é o estudo de associação. O primeiro resultado de associação positiva para as FL±PNS foi com variantes no TGFA (*transforming growth fator- alpha*) (ARDINGER et al, 1989). Os estudos de associação inicialmente eram feitos por seleção de variantes em genes candidatos funcionais ou genes com evidência de ligação para as fissuras (SATOKATA & MAAS, 1994; TOLAROVA et al, 1998; ZUCCHERO *et al.* , 2004). Mais recentemente, tem-se usado uma abordagem genômica, onde são incluídos marcadores dispersos no genoma sem uma premissa de loci candidatos, o que corresponde aos GWAS (*Genome Wide Association Study)* o que tem possibilitado a descoberta de novos *loci* e validação de alguns candidatos (MARIAN *et al.* , 2012)

Entre os loci investigados pelas diversas abordagens, vários alelos de risco têm sido identificados como de predisposição às FL±P NS, dentre estes, as variantes polimórficas do *IRF6* estão entre as que têm mostrado maior replicação nos vários estudos (PASSOS-BUENO *et al.* , 2004; CARINCI *et al.* , 2007; BRITO *et al.* , 2012). O primeiro estudo a sugerir que variações polimórficas no *IRF6* estavam associadas à predisposição a FL±PNS foi realizado por Zucchero e colaboradores (2004). O *IRF6* foi considerado um gene candidato devido ao fato de ser responsável pela SVW que possui uma grande sobreposição fenotípica com a FL±PNS. (ZUCCHERO *et al.* , 2004; JUGESSUR *et al.* , 2008; RAHIMOV *et al.* , 2008). A associação de diversos SNV de *IRF6* com a doença tem sido identificada e confirmada através de diversos estudos, incluindo GWAS (BEATY *et al.* , 2010a; BIRNBAUM *et al.* , 2009b; BLANTON *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2012a).

Em revisão realizada por Brito et al (2012), foi sumarizado os principais locos/genes candidatos para FL±PNS obtidos por 4 estudos GWAS (Figura 3).

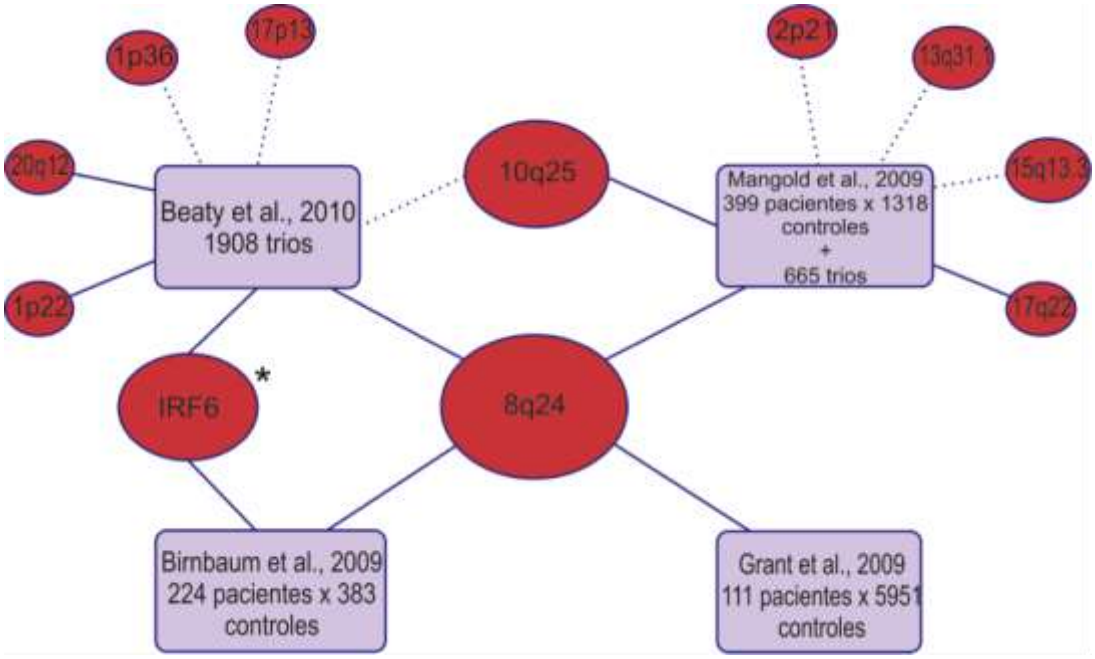


Figura 3: Diagrama representando os principais *loci* associados a FL±P NS por GWAS. Linhas pontilhadas representam associações marginais, enquanto linhas sólidas representam associações que são comumente aceitas em GWAS ($p<10^{-7}$). (Modificado de BRITO *et al.* , 2012c).

Até a presente data, além do *IRF6*, os loci mais corroborados como implicados na etiologia das FL±PNS foram a região 8q24.21 um deserto gênico inequivocamente implicado em suscetibilidade a FL±PNS e a região 10q25.3 (BIRNBAUN *et al.* , 2009a, MANGOLD *et al.* , 2009; ZUCCHERO *et al.* , 2004). Entretanto, apesar da implicação destes loci na etiologia das fissuras, como fatores de risco genético, os mesmo não explicam os altos valores de herdabilidade encontrados nos estudos que avaliam a contribuição genética nas fissuras.

1.3.3.2. Fatores ambientais associados às FL±PNS

Diversos estudos foram desenvolvidos para detectar a influência de fatores ambientais no surgimento de FL±PNS. As associações mais consistentes encontradas são relacionadas ao uso de anticonvulsivantes na gravidez (diazepam, fenitoína e fenobarbital), uso de corticosteróides e hipertermia gestacional. Outras associações menos consistentes ocorrem com o tabagismo, uso de ácido retinóico, exposição a solventes orgânicos e agrotóxicos na gravidez. As deficiências nutricionais de zinco,

ácido fólico e vitamina B6 também estão associadas ao aumento na incidência de fissuras e a suplementação nutricional destes elementos vem sendo incentivada na gravidez. Logo, uma gravidez bem planejada parece conferir proteção ao surgimento de fissuras orofaciais (revisão em MOSSEY *et al.* , 2009).

A identificação dos componentes ambientais das fissuras e suas interações com os genes exigem abordagens complexas e de tamanho amostral significante, portanto há uma limitação no número de estudos que conseguem fornecer esses dados. O tabagismo materno, principalmente no período inicial da gravidez, tem sido associado a um aumentado do risco de desenvolver FL±P em até 30% (LITTLE *et al.* , 2002) e há a possibilidade de que genes em vias metabólicas específicas, como os genes *NOS3* (*nitric oxide synthase 3*) e *GSTT1*(*glutationa s-transferase-θ1*) possam estar associados com essa susceptibilidade à FL±P NS na presença de tabagismo materno (SHI, *et al.* , 2007; VAN ROOIJ et al, 2001; LAMMER *et al.* 2005), entretanto, a associação dessas variantes ainda é controversa.

Outro fator ambiental de risco, porém ainda inconsistente, é a exposição do concepto ao etilismo materno, principalmente em situações de consumo excessivo de álcool (grandes doses em um curto período) (MOSSEY & LITTLE, 2009). Esta associação é suportada pela relação entre consumo de álcool e variantes no gene da enzima álcool desidrogenase 1C (*ADH1C*) (BOYLES *et al.* , 2009; WEHBY & MURRAY, 2010).

A deficiência materna de folato é um fator nutricional que também vem sendo relacionado com o desenvolvimento de FL±PNS. Esta associação baseia-se em estudos observacionais e ensaios intervencionistas que adotaram a suplementação de ácido fólico para prevenir a recorrência de FL±P em famílias (WEHBY & MURRAY, 2010; WEHBY *et al.* , 2013). No entanto, os resultados dos estudos sobre programas de fortificação de alimentos com ácido fólico permanecem controversos (LOPEZ-CAMELO *et al.* , 2010).

Outros fatores, como deficiência de multivitaminas, obesidade materna e infecções já foram apontadas como fatores de risco, porém ainda não há consenso sobre a contribuição destes fatores na predisposição à FL±P NS (DIXON *et al.* , 2011; MOSSEY *et al.* , 2009).

Estes achados provêem evidência de que fatores ambientais e interações gene-ambiente são importantes para o desenvolvimento de FL±PNS, e estudos prospectivos

com poder suficiente para detectar esses efeitos serão importantes para a elucidação desses fatores.

1.4. FISSURAS PALATINAS (FP)

1.4.1. Epidemiologia das FP

Estima-se que a prevalência das FP, no geral, esteja em torno de 1:1200 nascimentos, sendo mais alta na Austrália, Escandinávia, Escócia e França e sendo discretamente mais comum entre mulheres (MANGOLD et al, 2009; revisão em STEVENSON & HALL, 2006). Para as FPNS, esta prevalência cai para 1:2400 (MANGOLD *et al.* 2011).

Quando, os casos são avaliados de acordo com a extensão do defeito, os casos de FP completa são mais comuns em mulheres, enquanto nos casos de FP de palato mole não há diferença entre sexos. A incidência de fissuras atingindo apenas a úvula em caucasóides fica em torno de 1:80 nascimentos. A incidência de úvula bífida completa é aproximadamente 1:300 sem variação entre os sexos. Frequentemente, a úvula bífida ocorre acompanhada de fissura de palato submucosa, onde há uma fusão imperfeita do véu palatino, conservando intacta a superfície da mucosa. Estima-se uma incidência de 1:1200 a 1:2000 nascimentos para as FP submucosas (GORLIN et al, 2001).

1.4.2. Etiologia das FP sindrômicas (FP)

A maioria dos estudos tem confirmado que as FP são mais frequentemente associadas com outros defeitos do que as FL±P. Programas de vigilância em defeitos congênitos documentaram a associação de FP com outras anomalias numa frequência que variou de 46,7% a 51,7% . Segundo o OMIM, já foram descritas mais de 250 síndromes associadas com FP (maiores informações disponíveis em: http://www.omim.org/search?index=clinicalSynopsis&search=%22Cleft+palate%22&sort =score%20desc&start=9&limit=10). Entre as síndromes que apresentam FP como uma de suas características, podemos citar a síndrome de Stickler e a Displasia espondiloepifiseal congênita (ambas apresentam herança autossômico dominante e mutação no colágeno tipo 2), a SVW, além da Síndrome Velocardiofacial (revisão em STEVENSON & HALL, 2006).

Entre as cromossomopatias associadas com FP, há diversos relatos de casos de deleções intersticiais ou terminais, duplicações parciais, inversões, isocromossomos e dissomias uniparentais envolvendo quase todos os cromossomos (pesquisa realizada no software Possum®), como apresentado na Tabela II:

Tabela III: Algumas alterações cromossômicas descritas em síndromes que apresentam a FP em seu quadro clínico.

Alteração cromossômica	**Cromossomos envolvidos**
Trissomia	16
Trissomia em mosaico	8
Trissomia parcial	10p
Deleção parcial p	3p,8p,17p, 18p, 19p13.3-pter
Deleção parcial q	1q(q12-q21.3), 1q(q41-q42), 1q, 2q,3q 4q,5q, 6q7q,8q,11q, 13q, 15q, 16q, 17q,18q , Xq22.1
Duplicação parcial p	5p,7p, 13p, 16p13.3, 16p , 20p
Duplicação parcial q	1q, 3q, 5q,7q, 10q, 12q, 14q,15q, 17q, 22q11.2, Xq27.3q28
Inversão	inv dup(15), inv(7)(q21.3q35)
Dissomia uniparental	mUPD14
Isocromossomo	i18p

Entre as síndromes associadas com FP, a mais freqüente é a síndrome Velocardiofacial (SVCF; MIM 192430). Trata-se de uma desordem de herança autossômica dominante que tem, como principal mecanismo patogênico, uma microdeleção submicroscópica na região cromossômica 22q11.2, geralmente abrangendo 1,5 Mb ou 3 Mb. Trata-se da forma mais comum de FP, sendo responsável por cerca de 8% dos casos das FP, apresentando uma prevalência 1:2000-7000 (SCAMBLER, 2000). O termo "síndrome da deleção 22q11.2 " é agora utilizada para referir-se a todos os casos causados por microdeleções nesta região, incluindo, além da SVCF, a síndrome de DiGeorge (MIM 188400). Caracteriza-se principalmente pela presença de anomalias cardíacas (defeitos conotruncais, predominantemente tetralogia de Fallot e defeitos do septo conoventricular), FP de graus variáveis (variando de FP completa a fissura submucosa e insuficiência velofaríngea), dismorfias faciais (fissura palpebral estreita e nariz longo, entre outras), hipoplasia do timo e de déficit de aprendizagem (SHPRINTZEN, 1978), porém, o espectro de variabilidade clínica é

muito grande. O diagnóstico clínico para este grupo de pacientes é geralmente difícil, e os testes genéticos são frequentemente recomendadas na presença de, pelo menos, duas características clínicas da síndrome, tais como insuficiência velofaríngea e defeitos cardíacos (SOMMERLAD *et al.* , 2002). Além disso, os pacientes podem desenvolver psicose de início tardio ou distúrbios comportamentais, tais como esquizofrenia ou distúrbios bipolares (SHPRINTZEN *et al.* , 1992). A gravidade da síndrome não é dependente do tamanho da deleção (CARLSON *et al.* , 1997; SANDRIN-GARCIA et al, 2007) e diversos estudos apontaram perda de uma cópia de TBX1 como o principal agente etiológico para as alterações fenotípicas (CHIEFFO et al, 1997; MERSCHER *et al.* , 2001). No entanto, outros fatores ambientais ou genômicos também podem influenciar no fenótipo. A identificação de deleção 22q11.2 em pacientes com suspeita clinica de SVCF é importante para fins de aconselhamento genético, bem como para discutir o prognóstico e intervenção cirúrgica, já que se sabe que nesta condição pode haver um achado relativamente comum, como a presença de artérias carótidas internas numa posição anatômica anormal, que interfirirá na escolha da técnica cirúrgica a ser utilizada na palatoplastia (revisto por SAMAM & TATUM, 2012).

Além da SVCF, diversas outras síndromes gênicas associadas a presença de FP já tiveram parte de sua etiologia elucidada e as mutações causativas identificadas (Tabela III):

Tabela IV: Síndromes com FP nas quais os alelos patogênicos foram identificados.

Síndrome	**Gene identificado**
Oculofaciocardiodental com FP	*BCOR*
CHARGE	*CHD7*
Pterígio múltiplo letal; Síndrome de Escobar	*CHRNG*
Stickler tipo 1	*COL2A1*
Stickler tipo 2	*COL11A1*
Stickler tipo 3	*COL11A2*
Desmosterolosis	*DHCR24*
Smith-Lemli-Opitz	*DHCR7*
Miller	*DHODH*
Kallmann	*FGFR1*
Crouzon	*FGFR2*

Apert	*FGFR2*
Otopalatodigital tipos 1 and 2	*FLNA*
Larsen; Atelosteogenesis	*FLNB*
Linfedema hereditário com distiquíase	*FOXC2*
Bamforth-Lazarus	*FOXE1*
Oro-facial-digital	*GLI3*
Andersen	*KCNJ2*
Kabuki	*MLL2*
Cornelia de Lange	*NIPBL*
Deficiência mental ligada ao X	*PQBP1*
Displasia Diastrófica	*SLC26A2*
Displasia Campomélica	*SOX9*
Pierre Robin	*SOX9*
Anquiloglossia e FP ligada ao X	*TBX22*
Treacher-Collins	*TCOF1*
Loeys-Dietz	*TGFBR1e TGFBR2*
Saethre-Chotzen	*TWIST*

Revisão realizada por Dixon *et al.* (2011).

1.4.3. Etiologia das FP não sindrômicas (FPNS)

As FPNS representam 50% dos casos de FP (STANIER & MOORE, 2004; JUGESSUR et al, 2005). Em estudos envolvendo gêmeos, observou-se uma concordância para FP isolada de 35% em monozigóticos e 7,8% em gêmeos dizigóticos, o que sugere uma alta herdabilidade (~70%) (GORLIN *et al.* , 2001). Outros estudos estimaram valores de herdabilidade de 85% e 90% (CHRISTENSEN & MITCHELL, 1996; FITZPATRICK & FARRALL, 1993). O melhor modelo para explicar a agregação familiar de FPNS e que se adapta a maioria dos achados epidemiológicos é o de herança multifatorial, com efeitos aditivos de fatores genéticos frequentes e ambientais desencadeantes da malformação (CHRISTENSEN & MITCHELL, 1996; FRASER, 1974; SCHUTTE E MURRAY, 1999; GORLIN *et al.* , 2001, GROSEN *et al.*, 2010; MARAZITA, 2012). Uma hipótese alternativa seria que as FP sejam muito heterogêneas e mutações raras em vários genes poderiam então contribuir para a sua etiologia, pelo menos em uma proporção dos casos.

1.4.3.1. Fatores genéticos associados às FPNS

O primeiro estudo de ligação com o objetivo de identificar loci de suscetibilidade de FPNS, foi realizado por Koillinen *et al.* (2005). Após analisar 24 famílias finlandesas, sugeriu-se as regiões cromossômicas 1p34, 2p24-25 e 12q21 como loci candidatos, porém, foi detectada apenas uma significância estatística limítrofe. Em outro estudo mais recente, foi sugerido a correlação do gene Fas-associated factor-1 gene (FAF1) com as FPNS em uma grande amostra multi-étnica (GHASSIBE-SABBAGH *et al.* , 2011). Alguns autores também relataram duplicações cromossômicas, deleções e rearranjos em pacientes FPNS (BREWER *et al.* , 1999) . No entanto, os genes localizados nessas regiões cromossômicas carecem de confirmação com relação ao seu papel patogênico.

Beaty *et al.* (2001) e Van der Boogard et al (2000) documentaram uma associação entre FPNS e mutações no gene MSX1. Mutações nos genes FGFR1 e *IRF6* também podem ser responsáveis por uma proporção das FPNS. Estudos recentes demonstraram que mutações inativadoras no gene TBX22 podem ser responsáveis por 2-4% das FPNS na América do Norte e no Brasil (MARÇANO *et al.* , 2004). No entanto, em contraste com a FL ± PNS, apenas alguns estudos sobre a base genética da FPNS foram realizados, provavelmente por causa de sua prevalência mais prevalência e maior dificuldade de detecção.

1.4.3.2. Fatores ambientais associados às FPNS

Entre os agentes teratogênicos associados com FPNS, o tabagismo é o mais importante (WYSZYNSKI & WU, 1997), porém, substâncias como, álcool e ácido retinóico já foram relatados como associados às FP e outras malformações Além disso, alguns anticonvulsivantes específicos, como por exemplo o ácido valpróico, produziram evidências de associação com fissura palatina (revisão em STEVENSON & HALL, 2006).

Beaty *et al.* (2011) realizaram um GWAS em 550 trios de ascendências mistas e, embora eles não tenham encontrado resultados significativos testando as associações de marcadores genéticos com fenótipo , obtiveram resultados interessantes quando

realizaram os testes de associação condicionado no tabagismo materno, consumo de álcool e suplementação de vitamina: foi sugerido uma associação de TBK1 , ZNF236 , MLLT3 , SMC2 e BAALC . Nenhum dos loci levantados nestes estudos foram comuns àqueles previamente sugeridos para FL±PNS.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A maioria dos indivíduos afetados por fissuras labiais e palatinas requerem um tratamento multidisciplinar, duradouro e oneroso de reabilitação. O estabelecimento do diagnóstico etiológico específico é essencial na tentativa de se definir melhor o prognóstico para o indivíduo afetado, determinar uma terapêutica mais específica e realizar um aconselhamento genético mais preciso para as futuras proles das famílias acometidas. A elucidação deste diagnóstico muitas vezes é complexa e nem sempre é alcançada apenas com o exame clínico. Portanto, eventualmente, faz-se necessário a utilização de ferramentas complementares, como o uso de testes genéticos para auxílio diagnóstico.

Outro aspecto, no estudo das fissuras lábio palatinas, tão importante quanto a busca por uma diagnóstico clínico preciso, é a elucidação das características epidemiológicas e mecanismos etiológicos das fissuras, em especial das FPNS, a qual é objeto de um menor número de pesquisas quando comparada com as FL±PNS, provavelmente devido à sua menor prevalência e maior dificuldade de detecção. Estudos epidemiológicos podem fornecer informações relevantes tanto para o delineamento de estudos genéticos quanto na definição de estratégias de prevenção de fissuras, ao se conhecer qual a parcela de participação dos fatores genéticos e ambientais na etiologia das FP em nossa população.

Considerando essas ponderações, este trabalho objetiva averiguar a relevância do uso do estudo do *IRF6* no auxílio diagnóstico de indivíduos afetados por FP e FL±P e verificar se fatores genéticos contribuem para a variação fenotípica das FPNS em uma população brasileira. Para tanto, desenvolvemos os seguintes objetivos específicos:

(i) Realizar análises de mutações no *IRF6* em indivíduos portadores de FL±P e FP classificadas a priori como NS, sem fossetas labiais, com

história familiar positiva para fissuras, considerando-se parentes de I, II ou III grau;

(ii) Averiguar a prevalência de indivíduos afetados pela SVW dentre os indivíduos classificados a priori como afetados por fissuras não sindrômicas;

(iii) Estabelecer critérios para indicação da triagem de mutações do *IRF6* baseados em estudos populacionais com tamanho amostral expressivo e representativo da nossa população;

(iv) Estimar a herdabilidade e risco de recorrência das FPNS;

(v) Verificar se a consanguinidade é um fator de risco para FPNS.

Capítulo 1. Identificação e avaliação do impacto fenotípico de variantes no *IRF6* em famílias com fissuras orais não sindrômicas

"Identification and evaluation of the phenotypic impact of variants in *IRF6* in families with nonsyndromic oral clefts"

Abstract:

Cleft lip with or without cleft palate (CL±P) and cleft palate (CP) are heterogeneous and prevalent clinic conditions. Except for some cases, CL±P and PC are considered malformation with distinct etiology, both with high heritability. The inheritance pattern proposed for these oral clefts is multifactorial, with the model "common disease-common variant". A worldwide effort has been made in an attempt to identify genetic risk factors predisposing to these malformations, particularly for CL±P. A candidate gene suggested for CL±P nonsyndromic is *IRF6*, since loss-of- function mutations are causative of Van der Woude syndrome. This syndromic form of oral cleft differs from nonsyndromic forms only by the occurrence of pits in the lower lip. Association between CL±P and common variants in *IRF6* has been observed in several studies of different populations, but the results do not explain the high heritability of CL±P. Another model that has been proposed for these multifactorial inheritance malformation is tme model "common disease-rare variants". Given these issues, the present study was conducted to test the following hypotheses: a) determine whether a proportion of cases of nonsyndromic CL±P or CP result from pathogenic loss-of-function mutations in *IRF6*, which would then represent attenuated forms of Van der Woude syndrome b) verify whether rare variants in *IRF6* are associated with predisposition to CL±P or CP c) verify whether common variants in *IRF6* are associated with the occurrence of CL±P or CP in familial cases. In order to test these hypotheses, the *IRF6* was sequenced for at least 304 family cases from different regions of the country. The results were compared with 800 brazilian controls and from international databases. The results suggest that the frequency of attenuated forms of Van der Woude syndrome among nonsyndromic familial cases is about 1%. On the other hand, new rare variants of unknown clinical significance were found in approximately 3.3% of the cases (10/304). Moreover, it was observed an excess of variants in the 5'UTR region in the affected individuals in comparison with brazilian controls, suggesting that they have a functional effect on

IRF6 control. These results reveal the importance of studying the effect of different types of variants in *IRF6* in patients with oral clefts.
Key words: Cleft lip and palate; Van der Woude syndrome; *IRF6*.

Resumo:

As fissuras labiais com ou sem fissura palatina palatinas (FL±P) e as fissuras palatinas (FP) são condições clínicas heterogêneas e prevalentes. Exceto em algumas instâncias, FL±P e FP são consideradas malformações com etiologias distintas, ambas com alta herdabilidade. O padrão de herança proposto para estas fissuras orais é o multifatorial, com o modelo "doenças comuns-variantes comuns". Um esforço mundial tem sido feito na tentativa de se identificar os fatores de risco genético de predisposição a estas malformações, particularmente para as FL±P. Um gene candidato sugerido para as FL±P não sindrômicas é o *IRF6*, uma vez que mutações que levam a perda de sua função são causativas da síndrome de Van der Woude. Esta forma sindrômica de fissura-oral difere das formas não sindrômicas apenas pela ocorrência de fossetas no lábio inferior (ou "pits"). Associação entre FL±P e variantes comuns no *IRF6* tem sido observada em vários estudos de diferentes populações, porém os resultados obtidos não explicam a alta herdabilidade das FL±P. Um outro modelo que tem sido proposto para estas malformações de herança multifatorial, é o modelo de "doenças comuns-variantes raras". Diante destas questões, o presente trabalho foi realizado para testar as seguintes hipóteses: a) verificar se uma proporção dos casos de FL±P ou FP não sindrômicas é decorrente de mutações patogênicas de perda de função do *IRF6*, e que então representariam formas frustras da síndrome de Van der Woude; b) verificar se mutações raras no *IRF6*, estão associadas a predisposição de FL±P ou FP; c) verificar se variantes comuns no *IRF6* estão associadas a ocorrência de FL±P ou FP em casos familiais. Para testar estas hipóteses, o *IRF6* foi sequenciado em pelo menos 304 casos familiais averiguados em diferentes regiões do país. Os resultados foram comparados com cerca de 800 controles da população brasileira e com bancos de dados internacionais. Os resultados obtidos sugerem que a frequência de formas frustras da síndrome de Van der Woude entre os casos familiais NS é aproximadamente 1%. Por outro lado, variantes raras novas de significado clínico ainda desconhecido foram encontradas em cerca de 3,3% dos casos (10/304). Ainda, foi observado um excesso de variantes na região 5´UTR nos afetados por fissura quando comparados aos controles

brasileiros, o que sugere que estas tenham um efeito funcional na regulação do *IRF6*. Estes resultados sugerem a importância de se estudar o efeito dos diversos tipos de variantes no *IRF6* em pacientes com fissuras orais.
Palavras-chave: Fissuras labiais e palatinas; Síndrome de Van der Woude; *IRF6*.

1. Introdução:

As fissuras labiais com ou sem fissura palatina (FL+P) e as fissuras palatinas (FP) não sindrômicas (NS), representam 70% dos casos totais de FL±P e 50% dos casos totais de FP (STANIER & MOORE, 2004; JUGESSUR *et al.*, 2005). As incidências destas formas NS são 1:1000 e 1: 24000, respectivamente (MANGOLD *et al.*, 2011). Clinicamente, caracterizam-se pela ocorrência da fissura orofacial sem nenhuma outra malformação associada. As FL±P e FP NS, objetos deste estudo, abrangem um amplo espectro de variabilidade clínica, desde formas quase que subclínicas, como uma simples cicatriz labial unilateral ou apenas úvula bífida, até uma fissura labial bilateral com fissura palatina completa.

As FL±P e FP são consideradas entidades distintas, com base em diferenças embriológicas, epidemiológicas e genéticas (KERRIGAN *et al.*, 2000; JIANG *et al.*, 2006) e, geralmente, há segregação do mesmo subtipo de fissura em uma mesma família (KOT & KRUK-JEROMINI, 2007). Exceções a esta ultima regra são observadas, em algumas formas sindrômicas de fissuras orais, como a síndrome de Van der Woude (FRASER, 1974; NEILSON *et al.*, 2002; RUTLEDGE *et al.*, 2010). A síndrome de Van der Woude (SVW) é a mais freqüente das formas sindrômicas de fissuras, com uma incidência de 3,6:100.000 nascimentos (BURDICK, 1986), e é responsável por cerca de 2% de todos os casos de FL±P (SCHUTTE *et al.*, 1996; RINTALA & RANTA, 1981). Trata-se de uma condição de herança autossômica dominante, com penetrância elevada (89-99%) (BURDICK *et al.*, 1985) e se caracteriza clinicamente principalmente por fissuras orais e fossetas nos lábios inferiores (VAN DER WOUDE, 1954; RIZOS & SPYROPOULOS, 2004). Variantes em heterozigose que levam à perda de função no *IRF6* são responsáveis por aproximadamente 68% dos casos de SVW (KONDO *et al.*, 2001; DE LIMA *et al.*, 2009). Já foram descritas mais de 200 variantes patogênicas no *IRF6* causativas da SVW, e cerca de 80% destas

variantes têm sido encontrados nos exons 3, 4 , 7 e 9 (DURDA *et al.*,1993). Variantes patogênicas no exon 4 estão mais frequentemente associadas a uma forma alélica da SVW, a síndrome do pterígio popliíteal (SPP; MIM 119500), uma desordem que apresenta, além das anomalias faciais típicas da SVW, pterígio popliteal bilateral, sindactilia e anomalias genitais (DURDA *et al.*, 1993; KONDO *et al.*, 2002; DE LIMA *et al.*, 2009).

O padrão de herança mais aceito para fissuras orais NS é o multifatorial, no qual há contribuição de fatores genéticos e ambientais na determinação do fenótipo. (GROSEN *et al.*, 2010). Vários estudos em diversas populações, incluindo a população brasileira, têm estimado uma alta herdabilidade que têm variado entre 53% e 84% em diversas populações de FL±PNS (LIN *et al.*, 1999; STOLL *et al.*, 1991; CALZOLARI *et al.*, 1988; MENEGOTTO & SALZANO, 1991a; BRITO *et al.*, 2011), e entre 85% e 95% para FPNS (CHRISTENSEN & MITCHELL, 1996; FITZPATRICK & FARRALL, 1993; MEIRA et al., 2014 (presente dissertação).

Tem-se postulado que variantes (SNV:"single nucleotide variants") comuns estejam associadas à predisposição destas fissuras, ou seja, as fissuras orais NS seguem o modelo no qual " doenças comuns são causadas por variantes comuns" (*MAF* "minor allele frequency" >5%), as quais individualmente possuem um efeito menor, porém, quando combinadas, conferem um grande risco à doença (BODMER & BONILA, 2008).

Na tentativa de determinar, quais os fatores genéticos envolvidos na etiologia desta malformação, diversas abordagens metodológicas, como estudos de ligação e de associação, levaram a identificação de vários locos candidatos. Dentre eles, variantes no *IRF6* (*interferon regulatory factor 6*) são as que têm sido mais replicadas em estudos de associação com FL±PNS (ZUCCHERO *et al.*, 2004; JUGESSUR *et al.*, 2008; RAHIMOV *et al.*, 2008, BRITO *ET AL.*, 2011), e portanto, o *IRF6* tem sido considerado um locus candidato para a predisposição das fissuras orais não sindrômicas. Contudo, o valor de *odds ratio* (em torno de 2x) obtido nestes estudos, não explicam totalmente o valor alto herdabilidade das FL±PNS (DIXON et al., 2011).

É possível que as FL+PNS e FPNS constituam um grupo extremamente heterogêneo, que incluam formas sindrômicas de fissuras orais com penetrância incompleta de algumas de suas características clínicas. Como exemplo, podemos citar a

penetrância incompleta das fossetas labiais na SVW. A presença de fossetas labiais é a principal característica clínica que permite distinguir os casos de SVW dos FL±PNS e FPNS, porém cerca de 15% dos pacientes diagnosticados com SVW não apresentam fossetas labiais (BURDICK *et al.,* 1985). Logo, é inevitável que um subgrupo de pacientes classificados como não sindrômico correspondam a formas frustras de SVW, e, portanto, seriam indivíduos portadores de variantes patogênicas (de perda de função) no *IRF6*.

Alguns grupos de pesquisadores, incluindo o nosso, analisaram o *IRF6* em pacientes com fissuras orais não sindrômicas. Os resultados são ainda controversos, uma vez que enquanto na nossa casuística 3% dos casos pareceram ser formas frustras de SVW, outros grupos não identificaram nenhuma variante patogênica no *IRF6* (JEHEE *et al.,* 2009; ZUCCHERO *et al.,* 2004; PEGELOW *et al.,* 2008; BIRNBAUM *et al.,* 2008; LARRABEE *et al.,* 2011; SALAHSHOURIFAR *et al.,* 2012; CHOU *et al.,* 2013).

Ainda, é possível que uma proporção dos casos de fissuras orais NS sejam decorrentes de variantes raras no *IRF6,* baseando-se no modelo "doenças comuns-variantes raras" como tem sido sugerido para algumas doenças complexas, porém ainda não testada para as fissuras orais não sindrômicas. Este modelo assume a presença de variantes raras (*MAF*<1%), que conferem efeito moderado/alto ao risco da doença. Tais variantes raras seriam em sua maioria população-específica, recentemente derivadas na população (BODMER & BONILA, 2008; MARIAN *et al.,* 2012). Essa hipótese está começando a ser testada por meio de sequenciamentos de nova geração de exomas ou genomas inteiros de afetados por FL±P NS (LESLIE & MURRAY, 2012).

Assim sendo, o presente trabalho foi desenvolvido para testar as seguintes hipóteses: a) verificar se uma proporção dos casos de FL±PNS ou FPNS são decorrentes de varientes patogênicas do tipo perda de função no *IRF6*, e que então representariam formas frustras da SVW; b) verificar se variantes raras no *IRF6*, estão associadas à predisposição a FL±P ou FP; c) verificar se SNV comuns em *IRF6* estão associadas à ocorrência de FL±P ou FP em casos familiais. Com o intuito de testarmos estas hipóteses, realizamos o seqüenciamento do *IRF6* em 304 indivíduos com FL+PNS e FP NS.

2. Métodos:

2.1. Tipo de Estudo: Trata-se de um estudo de série de casos.

2.2. População de pacientes fissurados:

A população estudada consistiu de famílias de pacientes fissurados atendidos pela equipe de profissionais do programa médico comunitário da organização não governamental *Operação Sorriso* (http://www.operationsmile.org/). Este programa contou com a colaboração dos hospitais locais entre os anos de 2007 e 2012 e foi sediado pelas cidades de Santarém (PA), Maceió (AL), Fortaleza (CE), Barbalha (CE) e Rio de janeiro (RJ). A amostra foi complementada por pacientes atendidos nos ambulatórios de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), do Hospital Menino Jesus em São Paulo e da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). É importante salientar que os pacientes foram atendidos nas cidades citadas, porém são procedentes também de cidades vizinhas. Critérios de classificação:

Os critérios de inclusão utilizados na amostra foram: presença de FL±PNS ou FP NS, ausência de fossetas labiais, história familial de parentes com fissuras, considerando-se parentes como parentesco em I grau (pais, irmãos e filhos), II grau (tios, sobrinhos, avós e meios-irmãos) e III grau (primos em primeiro grau). Portanto, são casos familiais que não preenchem os critérios clínicos de diagnóstico para a SVW.

Foram excluídas deste estudo as famílias nas quais se verificou que o propósito era portador de outra anomalia além da fissura, caracterizando uma possível forma sindrômica ou ainda que fosse portador de uma fissura mediana ou complexa.

2.3. População controle:

A população controle avaliada no presente estudo, foi submetida ao seqüenciamento exônico do *IRF6* por duas diferentes técnicas e foi proveniente de dois grupos. O grupo controle I consistiu de 305 indivíduos brasileiros não afetados por fissuras e com história familial negativa para esta malformação atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). No total, havia 123 mulheres e 182 homens com representantes provenientes das cinco regiões brasileiras, originários dos seguintes Estados: Amazonas (Região Norte), Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (Região Noerdeste), Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Região Sudeste), Mato Grosso (Região Centro-Oeste) e Paraná (Região Sul). Os indivíduos foram considerados como caucasóides, negróides ou “mulatos”. Não foi possível obter resultados de

seqüenciamento com qualidade satisfatória em todos os éxons para todos os controles. O número final de individuos submetidos ao seqüenciamento de Sanger e sua distribuição por exons encontra-se na Tabela V. A análise do grupo controle I foi específica e direcionada à identificação das variantes novas encontradas em nossa população de pacientes.

O grupo controle II[1] consistiu em 609 indivíduos brasileiros, averiguados no Estado de São Paulo, com idades acima de 60 anos. Esses indivíduos foram submetidos ao seqüenciamento do exoma, porém, apenas *IRF6* foi analisado neste estudo. Diferente do grupo controle I, na análise do grupo controle II, objetivou-se rastrear todas as variantes distribuídas ao longo dos exons e regiões intrônicas e de regulação flanqueadoras da região cofidicadora.

2.4. Instrumentos:

Durante o atendimento, foi aplicado um questionário (Anexo I) com o intuito de obter informações sobre outros casos de fissura na família, classificação anatômica da fissura do propósito (em unilateral, bilateral com ou sem envolvimento do palato), sexo, idade, informações acerca da gestação e desenvolvimento fetal, consanguinidade dos pais, grau de parentesco dos familiares afetados, presença de outras malformações associadas. As etapas seguintes ao atendimento consistiram: 1) na coleta de esfregaço de mucosa oral por meio de escova cervical ou do *Kit Oragene*® para coleta de saliva; 2) fotografia do paciente; 3) assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo II). Os pacientes e/ou responsáveis atendidos pela equipe participante deste projeto assinaram o TCLE, autorizando a coleta de material biológico para extração de DNA, além das fotografias e dos dados clínicos. As amostras de DNA desses pacientes foram incluídas no Biobanco do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH)/Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), cujo projeto foi aprovado após apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da nossa Instituição.

2.5. Análise molecular:

[1] Os resultados do seqüenciamento dos indivíduos do grupo controle II, foram obtidos a partir de um banco de dados de um trabalho em andamento coordenado pela Dra Mayana Zatz no CEGH –IB/USP.

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética do Desenvolvimento Humano (CEGH/IB-USP). As amostras da população de pacientes e dos controles do grupo I foram submetidas à análise molecular, através do Sequenciamento de Sanger, para triagem de mutações do *IRF6*.

O seqüenciamento do *IRF6* consistiu inicialmente da análise dos exons 3, 4 e 7, uma vez que, aproximadamente 78% das mutações patogênicas para SVW estão neles localizadas (KONDO *et al.*, 2002). Nos casos onde alterações não foram encontradas, partimos para a análise dos outros seis exons (exons 1, 2, 5, 6, 8 e 9).

A extração de DNA das amostras foi realizada com o kit de extração NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel).

O desenho dos primers foi realizado utilizando as ferramentas *PRIMER 3* versão 3.0 (ROZEN & SKALETSKY, 2000) e o Genome Browser da UCSC (Universidade da Califórnia em Santa Cruz, http://genome.ucsc.edu/) e checados com as ferramentas *BLAT e PCR in silico* da UCSC, além do programa *Gene Runner (*http://www.generunner.net/). Os primers desenhados correspondem aos exons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, sendo que este último apresenta duas subdivisões devido a sua longa extensão (9a e 9b) (Tabela I). Em todos os primers, solicitou-se a adição de uma cauda M13 (18 nucleotídeos adicionais) às fitas *forward* (F) e *reverse* (R) que equivalem às seguintes sequências TGTAAAACGACGGCCAGT (F) e CAGGAAACAGCTATGACC (R). Esta cauda é adicionada a cada primer para que sirva como marcador na reação de seqüenciamento, permitindo o uso de apenas um primer universal *F* e um primer universal *R*.

As seguintes regiões do *IRF6* foram amplificadas e seqüenciadas: as regiões codificantes (exons 3 a 8 e uma porçãodo exon 9); a região 5' não traduzida (5'UTR) que inclui os exons 1 e 2; parte da região 3' não traduzida (3'UTR) que inclui parte do exon 9, e as regiões correspondentes aos sítios de splice exon-intron extendendo-se até cerca de 100pb sobre as sequências intrônicas flanqueadoras. Uma extensão de 143pb correspondente à região *upstream* ao *IRF6* também foi seqüenciada.

Tabela I. Primers utilizados para amplificar por PCR os exons do *IRF6*.

Exon	Direção	Sequência do primer (5'-3')
1	F	5'AGTTAGAAGCGGAGGAGTAGGG 3'
	R	5'AAGTTCTCTCACCCCCTACAAA 3'
2	F	5'TAGGGCTTCTGAGCTTTACCAG 3'

	R	5'TGGAAGAGAAGGAAAATTGCTC 3'
3	F	5'GTGGCTGGCCTAATTCTTCTGC 3'
	R	5'GGCACCCCCATCATAAGCATTC 3'
4	F	5'TCTCTGTAAATCGGGGTTGG 3'
	R	5'TCTTAAGAGTGCAGCCCAGAA 3'
5	F	5'GGACATTGAGGGTGTGTACTGA 3'
	R	5'GACAGTCCCAAGGTCAAAACTC 3'
6	F	5'GTTCTCAGAGCATCAGCAAGTG 3'
	R	5'CTGGGCCAGTGTTTCTTTACTT 3'
7	F	5'CTTCCTGAATGCTGGTTGAAAG 3'
	R	5'AGGAAAGCAGGAAGGTGAAAGAC 3'
8	F	5'GGTGAATTCAAGCAGGCAGT 3'
	R	5'AAACCTACATGGGCTGATGG 3'
9a (primeira porção)	F	5'GTCTTCCTCAGGGCCTCTTT 3'
	R	5'AAACTCCCAGGCCAAATCTC 3'
9b (segunda porção)	F	5'TTGTGAATGCCATCTTCTTCC 3'
	R	5'AGAGCTCGATCCTGGACAAA 3'

As concentrações e volumes de reagentes utilizadas para obter um volume final de PCR de 25uL estão descritos na tabela abaixo, assim como as temperaturas de anelamento padronizadas para cada primer (Tabela II):

Tabela II. Concentrações e volumes de reagentes utilizadas na PCR e temperaturas de anelamento padronizadas para cada primer.

Primers	**Temperatura de anelamento**	**Buffer 10X**	**dNTP (2,5mM)**	**Taq DNA polimerase (5U/uL)**
1, 2, 5, 6, 9a	Touchdown 66-59ºC	2,5uL	1,5ul	0,2ul
3,7	66°C	2,5uL	1,5ul	0,2ul
4	66°C	2,5uL	1,0uL	0,2ul
8, 9b	Touchdown 69-62ºC	2,5uL	1,5ul	0,2ul
Exons 3, 4 e 7	primers F/R 20uM: 0,4uL			
Exons 1,2,5,6,7,8,9a e 9b	primers F/R 10uM: 0,25uL			

A programação padronizada para a PCR dos primers dos exons 3, 4 e 7 foi estabelecida da seguinte forma: denaturação inicial: 95ºC por 5 minutos, seguida por 35

ciclos de denaturação a 94ºC por 45 segundos, anelamento a 66ºC por 45 segundos, alongamento a 72ºC por 45 segundos e alongamento final a 72ºC por 10 minutos. Para os primers dos exons 1, 2, 5, 6 e 9a foi utilizado um modelo de programa *Touchdown* com as seguintes temperaturas: denaturação inicial: 95ºC por 4 minutos, seguida por 14 ciclos de denaturação a 94ºC por 30 segundos, anelamento a 66ºC por 1 minuto, redução de 0,5 ºC por ciclo e alongamento a 72ºC por 40 segundos, seguida por mais 16 ciclos de denaturação 94 ºC por 30 segundos, anelamento a 59ºC por 40 segundos, alongamento a 72ºC por 40 segundos e alongamento final a 72ºC por 10 minutos. Já para os primers do exon 8 e a segunda porção do 9 (9b), foi utilizado um programa *Touchdown*, substituindo-se a temperatura de anelamento inicial por 69ºC e final por 62ºC.

Após a análise do produto da PCR em eletroforese com gel de agarose a 1,5%, os produtos foram purificados utilizando os reagentes *Exonuclease I* (*Exo* I) para digerir excesso de primers e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (*SAP*) (Affymetrix®) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR.

Na reação de seqüenciamento de Sanger foi utilizado o *Big Dye® terminator V3.1* cycle sequencig kit (*Applied Biosystems®*, Foster City, Ca., USA), usando protocolos recomendados pelo fabricante. As seguintes concentrações e volumes de reagentes foram utilizadas para obter um volume final de 10uL (Tabela III).

Tabela III. Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de sequenciamento.

Reagentes	Concentração	Volume
Big Dye (Applied Biosystems®)	2,5x	2uL
Buffer Big Dye (Applied Biosystems®)	5x	1uL
M13 F ou M13R (Invitrogen®)	5uM	1uL
Produto de PCR	40ng/uL	1uL
H_2O milliQ	-	5uL
Total	-	10uL

A programação do termociclador padronizada para a reação de seqüenciamento foi estabelecida da seguinte forma: denaturação inicial 96ºC por 1 minuto, seguida por 30 ciclos de denaturação a 96ºC por 10 segundos, anelamento a 50ºC por 5 segundos, alongamento a 60ºC por 4 minutos e espera a 6ºC.

O produto final foi submetido a filtragem e purificação em placa de Sephadex® G-50 columns (*GE Healthcare*®) segundo protocolo próprio. Finalmente, as amostras foram submetidas a eletroforese em capilares no sequenciador automático ABI 3730 DNA *Analyser* (*Applied Biosystems*®).

2.6. *Softwares* para análise de dados:

O resultado do seqüenciamento foi analisado no programa *Sequencher*® (versão 5.1) (*Gene Codes Corporation*). As variantes encontradas foram confirmadas pelo seqüenciamento de ambas as fitas F e R. Os números de acesso das seqüências referência do DNA genômico referente ao cromossomo, DNA genômico referente ao gene, DNA complementar e proteína foram: NC_000001.10, NG_007081.2, NM_006147.3 e NP_006138.1, respectivamente (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq).

A nomenclatura utilizada para as variantes encontradas foi baseada nas regras de nomenclatura da HGVS (*Human Genome Variation Society* - http://www.hgvs.org/) e do *dbSNP* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html).

Para verificar o possível efeito das variantes novas sobre o *IRF6*, foi realizada uma análise *in silico* utilizando os softwares *Provean (*disponível em*:* http://provean.jcvi.org/index.php), *SIFT (*disponível em : http://sift.jcvi.org/) *e Poliphen* (disponível em : http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) para as variantes em regiões codificantes. Para a análise das variantes em regiões não codificantes, utilizamos os softwares *fastSNP*, *SNP-nexus. O*s softwares *Provean, SIFT e Poliphen*, são ferramentas utilizadas para predizer se uma substituição de aminoácido ou indel tem um impacto na função biológica protéica. *O fast SNP (disponível em:* http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw/pages/input_CandidateGeneSearch.jsp) detecta a presença de motivos de ligação de fatores de transcrição e motivos de regulação de splicing alternativo na localização do SNV. Já o *SNP-nexus* (disponível em: http://www.snp-nexus.org/), realiza uma busca por motivos de ligação de fatores de transcrição (utilizando um banco de dados diferente do utilizado pelo *fastSNP*), realiza uma busca por sequências alvo de microRNAs, ilhas CpGs e avalia a conservação da posição em vertebrados realizando uma análise ontogenética.

Para analise da interação entre genes associados co o *IRF6* utilizamos o software *IPA* (*Ingenuity Pathway Analysis.* Ingenuity®Systems, www.ingenuity.com).

Para realizar a análise estatística e analisar diferenças entre as classes genotípicas de afetados e controles da população brasileira, foi aplicado o teste de Fisher (*Fisher's exact test*) utilizando o GraphPad Software® disponível em http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm. O valor de P foi considerado estatisticamente significante quando <0,005.

3. Resultados:

3.1. Análise de mutações no *IRF6:*

A amostra estudada foi composta de 304 famílias afetadas por FL±PNS e FPNS averiguadas nos Estados do Ceará (Barbalha e Fortaleza), Alagoas (Maceió), Rio de Janeiro (Rio de Janeiro), Pará (Santarém) e São Paulo (São Paulo) (Tabela IV).

Tabela IV. Distribuição de probandos por localidade, sexo e tipo de fissura (FL±P ou FP).

Estado	Número de pacientes	Feminino	Masculino	FL±P	FP
Ceará	88	36	52	73	15
Alagoas	40	16	24	31	9
Rio de Janeiro	98	49	59	73	25
Pará	51	10	41	41	10
São Paulo	27	17	10	20	7
Total	306	130	186	238	66

Nossa população caracterizou-se fenotipicamente por 78,4% dos probandos com FL±P e por 21,6% com FP. Das 304 probandos, foi possível determinar o tipo específico de fissuras que acometiam os seus familiares em 185 casos, destes 131(70,8%) foram famílias onde segregavam exclusivamente FL±P, 25 famílias (13,5%) segregavam apenas FP e em 29 famílias (15,7%), ocorriam os dois tipos de fissuras.

Foi realizada a triagem de mutações nas regiões exônicas do *IRF6* em 304 pacientes fissurados. Além dos pacientes fissurados, foram avaliados dois grupos controles. A análise do grupo controle I foi direcionada à identificação das variantes novas encontradas em nossa população de pacientes.

Diante da qualidade insatisfatória do DNA em um número representativo dos pacientes, não foi possível obter resultados com qualidade satisfatória para todos os

éxons para todos os pacientes, conforme resumido nas tabelas V e VI. Na Tabela V, está apresentado o número de pacientes e de controles seqüenciados por exon, enquanto na Tabela VI apresenta o número de pacientes com resultado de sequenciamento por grupo de exons.

Tabela V. Número de pacientes e de controles submetidos ao sequenciamento do *IRF6* de acordo com o éxon.

Éxon	Total de pacientes	Total de indivíduos do grupo controle I
1	163	255
2	168	257
3	294	272
4	293	303
5	170	271
6	166	232
7	285	250
8	161	256
9a	167	260
9b	161	238

Região amplificada *exon 1*: além do exon 1, inclui segmento da região *upstream* ao *IRF6* e parte da região 5'UTR.

Região amplificada *exon 2*: além do exon 2, inclui parte da região 5'UTR.

Região amplificada *exon 9b*: inclui parte da região 3'UTR.

Tabela VI. Número de pacientes de acordo com o grupo de éxons sequenciados.

Éxons seqüenciados	Número de diferentes pacientes testados	Total de pacientes por grupos de exons
Todos os exons	144	144
Exons codificantes (3-9)	144 + 9	150
Exons 3, 4, 7, 9	150 + 9	159
Exons 3, 4, 7	159 + 116	275

A análise do resultado do seqüenciamento nos pacientes com fissuras revelou 35 variantes de nucleotídeo único (SNV- *Single Nucleotide Variants)*, sendo 26 variantes conhecidas e 9 novas, ou seja, não descritas previamente na literatura (baseados em artigos e bancos de dados internacionais, como o *1000 genomas*, *Hapmap e dbSNP;* www.ensembl.org), conforme detalhado abaixo (Figura 1). Deleções exônicas não foram detectadas nesta série de rastreio do *IRF6*.

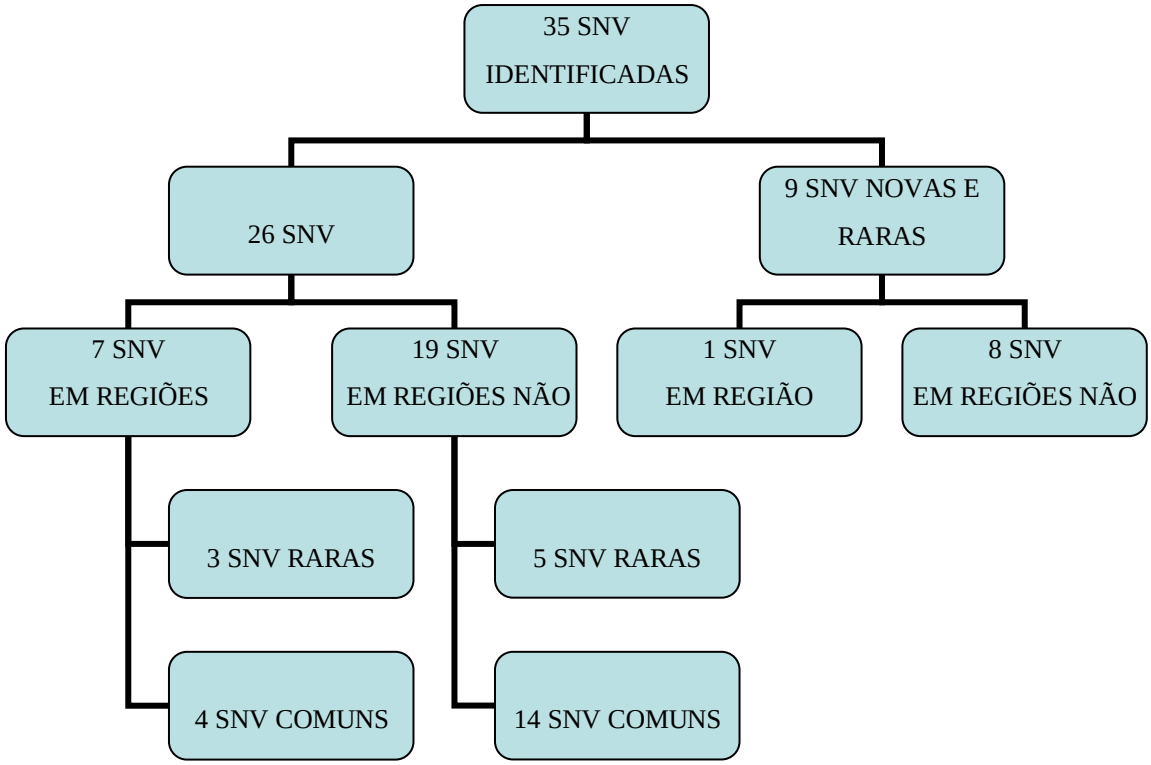


Figura 1. Tipos de SNV detectados na amostra de afetados.

Na avaliação do grupo controle II, foi possível verificar a detecção de 93 diferentes variantes nas regiões exônicas, intrônicas e de regulação flanqueadoras das regiões codificantes.

3.1.1. Variantes conhecidas:

Vinte e seis das 35 variantes encontradas já eram conhecidas, sendo previamente descritas na literatura. Destas 26 variantes, 8 foram consideradas *raras*, ou seja, a frequência do alelo mais raro foi <1% nos bancos de dados populacionais (http://www.1000genomes.org/) e 18 foram consideradas variantes *comuns* (freqüência alélica do alelo mais raro ≥ 1% nos mesmos bancos de dados).

Dentre os 26 SNV conhecidos, 7 localizam-se em regiões codificantes (Tabela VII):

- 5 SNV são sinônimos:
  - 1 no éxon 4: c.366G>A, p.Ser122=
  - 2 no éxon 5: c.390G>T, p.Gly130=; c.459G>T, p.Ser153=
  - 1 no éxon 7: c.1059C>T, p.Ser353=
  - 1 no éxon 8: c.1153T>C, p.Leu385=
- 2 SNV são não sinônimos ou *missense*:
  - 1 SNV no éxon 7: c.820G>A, p.Val274Ile
  - 1 SNV no éxon 3: c.5C>T, p.Ala2Val (CM022374)

Na tabela VII, também estão descritas as freqüências alélicas das variantes encontradas em dois grupos controle: controles da população geral do banco de dados do *1000 genomas* e do *grupo controle II* (indivíduos brasileiros). A denominação "população geral" (do banco de dados do *1000 genomas)* refere-se a todos os indivíduos analisados, para uma determinada variante, neste banco de dado, independente do grupo populacional.

Tabela VII. Variantes exônicas encontradas no presente estudo e previamente descritas na literatura. As variantes raras estão destacadas em na tabela.

Variantes dbSNP	**Região do gene**	**Posição genômica (NC_000001.10:)**	**Posição no RNAm (NM_006147.3:)**	**Efeito na proteína (NP_006138.1:)**	**Frequência genotípica na amostra estudada**	**Frequência alélica na amostra estudada**	**Frequência alélica no *1000 genomas***	**Frequência alélica no grupo controle II**	**Significado clínico**
rs28942093/ CM022374	Éxon3	g.209974754G>A	c.5C>T	p.Ala2Val	GG: 99,7% (293) GA: 0,3% (1) AA:0% (0)	G: 99,8% A: 0,2%	SNV patogênica rara.	Não encontrado	SVW (MIM 119300)
rs146068713	Éxon 4	g.209969706C>T	c.366G>A	p.Ser122=	CC: 99,7% (292) CT: 0,3% (1) TT: 0% (0)	C: 99,8% T: 0,2%	C: 100% T: 0%	Não encontrado	desconhecido
rs34907424	Éxon 5	g.209968753C>A	c.390G>T	p.Gly130=	CC: 95,7% (163) CA: 4,3% (7) AA: 0% (0)	C: 98% A: 2%	C: 98% A: 2%	C:98,6% A:1,4%	desconhecido
rs2013162	Éxon 5	g.209968684C>A	c.459G>T	p.Ser153=	CC: 39% (66) CA: 41% (70) AA:20% (34)	C: 59,4% A: 40,6%	C: 60% A: 40%	C:63,1% A:36,9%	desconhecido
rs2235371	Éxon 7	g.209964080C>T	c.820G>A	p.Val274Ile	CC: 79,7% (227) CT: 17,5% (50) TT:2,8% (8)	C: 88,4% T: 11,6%	C: 86% T: 14%	C:94,7% T:5,3%	OFC6* (MIM 608864)

rs116578701	Éxon 7	g.209963841G>A	c.1059C>T	p.Ser353=	GG: 99,7% (284) GA: 0,3% (1) AA:0% (0)	G: 99,8% A: 0,2%	G: 100% A: 0%	G: 99,92% A: 0,08%	desconhecido
rs61099902	Éxon 8	g.209963038A>G	c.1153T>C	p.Leu385=	AA: 96,3% (155) AG: 3,7% (6) GG: 0% (0)	A: 98% G: 2%	A: 99% G: 1%	A:99,2% G:0,8%	desconhecido

*OFC6 (MIM 608864): Fenótipo "Orofacial cleft 6, susceptibility to", SNVC associadas com esse fenótipo são consideradas variantes de susceptibilidade a fissuras orofaciais não sindrômicas (http://www.omim.org/).

Os 19 SNV restantes localizam-se em regiões do *IRF6* não codificantes, ou seja, região *upstream* ao gene, regiões 5'UTR, 3'UTR e íntrons (Tabela VIII):

- 3 SNV "upstream" ao *IRF6* (região regulatória): c.-304-115G>A; c.-304-93G>C; c.-304-9T>A.
- 5 SNV na região 5'UTR:
  - 1 SNV no éxon 1: c.-302A>T
    - 2 SNV no íntron 1: c.-75-4A>G
      c.-75-18_-75-17insC
  - 1 SNV no éxon 2: c.-73T>C
  - 1 SNV no íntron 2: c.-4+102T>C
- 7 SNV intrônicos:
  - 1 SNV no íntron 3: c.175-5 C>G
  - 1 SNV no íntron 4:c.380-106C>T
  - 1 SNV no íntron 6: c.667+27C>G
  - 2 SNV no íntron 7: c.1060+37 C>T; c.1061-301C>T
  - 2 SNV no íntron 8: c.1179+34T>C; c.1179+68T>C
- 4 SNV na região 3'UTR (região após o códon de parada da tradução protéica): c.*204C>T; c.*353T>C; c.*451A>G; c.*479T>G

Na tabela VIII, também estão descritas as freqüências alélicas das variantes encontradas nos grupos controle controles da população geral do banco de dados do *1000 genomas* e do grupo controle II de indivíduos brasileiros.

Tabela VIII. Variantes localizadas em regiões não codificantes encontradas no presente estudo e previamente descritas na literatura (http://www.ensembl.org/). As variantes raras estão destacadas na tabela.

Variante dbSNP	**Região do gene**	**Posição genômica (NC_000001.10:)**	**Posição no RNAm (NM_006147.3:)**	**Frequência genotípica da amostra estudada**	**Frequência alélica da amostra estudada**	**Frequência alélica no *1000 genomas***	**Frequência alélica no grupo controle II**	**Significado clínico**
rs7545542	upstream	g.209979635C>T	c.-304-115G>A	CC: 48,5% (79) CT: 35% (57) TT: 16,5% (27)	C: 66% T: 34%	C: 59% T: 41%	C:60,7% T:39,3%	desconhecido

rs7545538	upstream	g.209979613C>G	c.-304-93G>C	CC: 43% (70) CG: 41% (67) GG: 16% (26)	C: 63,5% G: 36,5%	C: 58% G: 42%	C:60% G:40%	desconhecido
rs34743335	upstream	g.209979529A>T	c.-304-9T>A	AA: 70% (114) AT: 25% (41) TT: 5% (8)	A: 82,5% T: 17,5%	A: 86% T: 14%	A:82% T:18%	desconhecido
rs12403006	5'UTR (Exon 1)	g.209979518T>A	c.-302A>T	TT: 71% (116) TA: 24% (39) AA: 5% (8)	T: 83% A: 17%	T: 86% A: 14%	T:84,5% A:15,5%	desconhecido
rs2235377	5'UTR (Intron 1)	g.209975392T>C	c.-75-4A>G	TT: 81% (136) TC: 16,6% (28) CC: 2,4% (4)	T: 89% C: 11%	T: 86% C: 14%	T: 95,8% C:4,2%	desconhecido
rs145034080	5'UTR (Intron 1)	g.209975405_209975406insG	c.-75-18_-75-17insC	_: 97,6% C: 2,4%	_: 97,6% C: 2,4%	_: 99% C: 1%	**Grupo I*** _: 98,4% C: 1,6%	desconhecido
rs861019	5'UTR (Exon 2)	g.209975386A>G	c.-73T>C	AA: 41% (68) AG: 42% (71) GG: 17% (29)	A: 62% G: 38%	A: 60% G: 40%	A:62,6% G:37,4%	desconhecido
rs147419621	5'UTR (Intron 2)	g.209975215A>G	c.-4+102T>C	AA: 98,8%(166) AG: 1,2 % (2) GG: 0% (0)	A: 99,4 % G: 0,6%	A: 99% G: 1%	Não encontrado	desconhecido
rs7552506	Íntron 3 (próximo a sítio de splice do Éxon 4)	g.209969902G>C	c.175-5 C>G	GG: 48,5% (142) GC: 41,5% (122) CC: 10% (29)	G:69% C:31%	G: 73% C: 27%	G:68,3% C:31,7%	desconhecido
rs41304121	Íntron 4	g.209968869G>A	c.380-106C>T	GG: 99,4% (169) GA: 0,6% (1) AA: 0% (0)	G:99,7% A:0,3%	G:100% A: 0%	G:99,84% A:0,16%	desconhecido
rs2235375	Íntron 6	g.209965587G>C	c.667+27C>G	GG: 39% (64) GC: 42% (70) CC: 19% (32)	G:60% C:40%	G: 60% C: 40%	G:63% C:37%	OFC6* (MIM 608864)
rs2235373	Íntron 7	g.209963803G>A	c.1060+37 C>T	GG: 63% (180) GA: 30,5% (87) AA: 6,5% (18)	G: 78% A: 22%	G: 73% A: 27%	G:77,9% A:22,1%	desconhecido
rs116094279	Íntron 7	g.209963431G>A	c.1061-301C>T	GG: 97,5% (157) GA: 2,5% (4) AA: 0% (0)	G:98,8% A:1,2%	G:100% A: 0%	Não encontrado	desconhecido
rs138771192	Íntron 8	g.209962978A>G	c.1179+34T>C	AA: 99,4% (160) AG: 0,6% (1) GG: 0% (0)	A: 99,7% G: 0,3%	A: 100% G: 0%	A:99,84% G:0,16%	desconhecido
rs145873101	Íntron 8	g.209962944A>G	c.1179+68T>C	AA: 98,2% (158) AG: 0,6% (1) GG: 1,2% (2)	A: 98,4% G: 1,6%	A: 100% G: 0%	A:99,35% G:0,65%	desconhecido
rs77906982	3'UTR	g.209961561G>A	c.*204C>T	GG: 95% (159) GA: 5% (8) AA: 0% (0)	G:97,6% A:2,4%	G: 99% A: 1%	G:98,1% A:1,9%	desconhecido
rs79863693	3'UTR	:g.209961412A>G	c.*353T>C	AA: 98,8%(159) AG: 1,2% (2) GG: 0% (0)	A: 99,4% G: 0,6%	A: 99% G: 1%	A:99,24% G:0,76%	desconhecido
rs17317411	3'UTR	g.209961314T>C	c.*451A > G	TT: 90,7% (146) TC: 8,7% (14) CC: 0,6% (1)	T: 95% C: 5%	T: 92% C: 8%	T:85,3% C:14,7%	desconhecido
rs75012801	3'UTR	g.209961286A>C	c.*479T>G	AA: 98% (158) AC: 2% (3) CC: 0% (0)	A: 99% C: 1%	A: 100% C: 0%	A:98,2% C:1,8%	desconhecido

*O SNV rs145034080 não foi encontrado no grupo controle II, porém foi encontrado no grupo controle I (composto por 514 cromossomos).

3.1.2. Variantes novas:

Foram detectadas 9 variantes novas, ou seja, não descritos previamente na literatura (Tabela IX). Todas as 9 variantes novas, foram consideradas variantes raras. Dentre estas, apenas 1 está em região codificante, como detalhado abaixo:

- 2 SNV *upstream* ao *IRF6* (região regulatória):c.-413C>T; c.-410A>C
- 3 SNV na região 5'UTR
  - 2 SNV no éxon 1: c.-273G>C; c.-216G>A
  - 1 SNV no íntron 2 (c.-3-9C>T)
- 3 SNV localizam-se na região 3'UTR, região após o códon de parada da tradução protéica: c.*199A>G; c.*293G>A; c.*382T>C
- 1 SNV no éxon 7: c.781G>A

Estas variantes não foram descritas nos artigos revisados, não estão registradas no banco de dados do *Human Gene Mutation* (http://www.hgmd.org), não estão descritas como polimorfismos no *NCBI dbSNP assembly* GRCh37.p13. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) e no *UCSC genome browser assembly* (Human Feb. 2009 GRCh37/hg19) (http://genome.ucsc.edu). Ainda, essas variantes novas não foram encontradas em nenhum dos cerca de 500 cromossomos do grupo controle I e nos 1218 cromossomos do grupo controle II e, portanto, foram consideradas como variantes raras.

Tabela IX: Variantes novas encontradas no presente estudo, sem descrição prévia na literatura**.**

Região do gene	**Posição genômica (NC_000001.10)**	**Posição gênica (NG_007081.2)**	**Posição no RNAm (NM_006147.3)**	**Frequência genotípica na amostra estudada**	**Frequência alélica na amostra estudada**	**Identificação dos pacientes**	**Significado clínico**
upstream	g.209979629G>A	g.4851C>T	c.-304-109C>T	GG:99,4%(162) GA:0,6% (1) AA:0% (0)	G:99,7% A:0,3%	F2654-1	indeterminado
upstream	g.209979626T>G	g.4854A>C	c.-304-106A>C	TT: 99,4% (162) TG:0,6% (1) GG:0% (0)	T:99,7% G:0,3%	F4523-1	indeterminado
5'UTR (Éxon 1)	g.209979489C>G	g.4991G>C	c.-273G>C	CC: 99,4% (162) CG:0,6% (1) GG:0% (0)	C:99,7% G:0,3%	F7321-1	indeterminado

5'UTR (Éxon 1)	g.209979432C>T	g.5048G>A	c.-216G>A	CC: 99,4% (162) CT:0,6% (1) TT:0% (0)	C:99,7% T:0,3%	F2680-1	indeterminado
5'UTR (Íntron2)	g.209974770G>A	g.9710C>T	c.-3-9C>T	GG: 99,7%(293) GA:0,3% (1) AA:0% (0)	G:99,8% A:0,2%	F5209-1	indeterminado
Éxon 7	g.209964119C>T	g.20361G>A	c.781G>A	CC: 99,7% (284) CT:0,3% (1) TT:0% (0)	C:99,8% T:0,2%	F7810-1	*p.(Asp261Asn) Provean, SIFT, Polyphen: benigna
3'UTR	g.209961566T>C	g.22914A>G	c.*199A>G	TT: 99,4% (166) TC: 0,6% (1) CC: 0% (0)	T: 99,7% C: 0,3%	F4523-2	indeterminado
3'UTR	g.209961472C>T	g.23008G>A	c.*293G>A	CC: 98,7% (159) CT:1,3% (2) TT:0% (0)	C:99,4% T:0,6%	F2668-1 F3460-1	indeterminado
3'UTR	g.209961383A>G	g.23097T>C	c.*382T>C	AA: 99,4%(160) AG: 0,6% (1) GG: 0% (0)	A:99,7% G: 0,3%	F6505-1	indeterminado

***** Refere-se ao efeito da mutação na proteína (p.Asp261Asn) e ao resultado da análise *in silico* desta variante através dos softwares Provean, SIFT, Polyphen, que foi considerada benigna.

3.2. Variantes e seu possível efeito funcional e no fenótipo:

3.2.1. Variantes conhecidas:

Três variantes, dentre as 26 conhecidas encontradas, são reconhecidamente relacionadas com o fenótipo das fissuras orais de acordo com dados prévios da literatura: rs2235371 (ZUCCHERO *et al.*, 2004) e rs2235375 (SCAPOLI *et al.*, 2005), são considerados como variantes de suscetibilidade às FL±PNS e a variante rs28942093 (KONDO *et al.*, 2002) é descrita como patogênica para a SVW. As duas primeiras são SNV comuns e parecem representar um fator de risco segundo um modelo de herança multifatorial para as fissuras NS, enquanto a terceira variante é rara. Estas e mais algumas variantes epecíficas serão discutidas em detalhes.

3.2.1.1. Variantes conhecidas comuns:

Dentre as 26 variantes conhecidas, 18 foram consideradas comuns (baseado nas freqüências alélicas no banco de dados *1000 genomas).* Destas 18, serão detalhados os

resultados das SNV já associadas com fissuras NS em algum estudo prévio. São elas: rs2235373, rs2235371, rs2235375, rs2235377, rs2013162, rs861019 e rs7552506. Além destas SNV, a variante rs145034080 será melhor caracterizada por ser a única variante tipo inserção dentre as encontradas em nossa população de afetados.

As SNV listadas abaixo, não foram associadas com fissuras até a presente data e o grupo de afetados apresentou freqüências alélicas próximas às dos controles (valores das freqüências descritos nas tabelas VII e VIII):

- rs34907424
- rs61099902
- rs7545542
- rs7545538
- rs34743335
- rs12403006
- rs147419621
- rs77906982
- rs79863693
- rs17317411

Como referido acima, a SNV rs145034080 foi a única variante tipo inserção detectada entre as 35 SNV encontradas em nossa população de afetados. As demais 34 variantes correspondem a mutações tipo troca de base nucleotídica. A SNV rs145034080 localiza-se na região 5'UTR (situada no intron 1) e corresponde a uma inserção de um mucleotídeo *C* na posição gênica c.-75-18_-75-17. Foi encontrada em 4/168 indivíduos (2,4%) genotipados para este SNV. Na população de controles do *1000 genomas*, a incidência encontrada foi de 1%, entretanto, até o momento só foram disponibilizados dados para dois grupos populacionais, os grupos de ancestralidade africana e ameríndia, sendo que a SNV em questão apresentou umavfrequência de 1% e 2% nestes grupos, respectivamente. Em um grupo de 257 controles brasileiros (grupo controle I), a freqüência desta inserção foi de 4/257 indivíduos (1,6%). Até a presente data, não foi descrita associação com fissuras para esta SNV.

As SNV que serão detalhadas a seguir já associadas com fissuras NS em algum estudo prévio. Entre elas, rs2235371 e rs2235375, são associadas com o fenótipo "Orofacial cleft 6, susceptibility to" (OFC6; MIM 608864) e consideradas variantes de susceptibilidade a fissuras orofaciais não sindrômicas (http://www.omim.org/) (ZUCCHERO et al, 2004; SCAPOLI et al, 2005):

a) rs2235371:

A mutação "*missense*" rs2235371 (c.820G>A; p.Val274Ile), situada no éxon 7, é uma variante comum localizada no domínio de ligação a proteínas do *IRF6*. Este SNV foi encontrado em 58 dos 285 pacientes (20,4%) genotipados para esta variante. Deste total de 285 pacientes, 61 tinham FP e 224 FL±P e dos 58 pacientes portadores desta variante, 14 tinham FP e 44 FL±P. Logo, observou-se que 23% (14/61) dos indivíduos com FP e 19,6% (44/224) dos indivíduos com FL±P apresentaram esta variante. Por fim, destes 58 pacientes com o SNV rs2235371, obtivemos, em apenas 34 casos, informações detalhadas sobre os tipos de fissuras em seus familiares. Verificou-se que 22 casos (64,7%) tinham padrão familiar de FL±P; 7 (20,6%) tinham padrão de FP e 5 (14,7%) segregavam os dois tipos de fissuras na família.

As freqüências alélicas, no locus rs2235371, dos afetados em nossa população estudada, dos controles brasileiros e dos controles do banco de dados do *1000 genomas* (http://www.1000genomes.org/) estão descritas na tabela VII. Verificamos que a freqüência alélica do alelo **A** *(*alelo menos comum*)* foi de 11,6% nos afetados e 14% no banco de dados do*1000 genomas*, porém nos controles brasileiros, essa frequência alélica foi de 5,3%, muito inferior à encontrada nos afetados.

Para verificar se houve diferença estatística entre as freqüências genotípicas de afetados versus controles da população brasileira (Grupo controle II) e de afetados versus controles da população geral do *1000 genomas*, foi aplicado o teste de Fisher (*Fisher's exact test***).** A distribuição genotípica nos afetados e controles para este SNV encontra-se na tabela X e a análise estatística utilizando o Teste de Fisher encontra-se na tabela XI.

Tabela X. Distribuição genotípica nos afetados e controles para o SNV rs2235371.

Genótipos	**Afetados n(%)**	**Grupo controle II* n(%)**	**Controles *1000 genomas*** n(%)**
GG	227 (79,7%)	548 (90%)	849 (77,7%)
GA	50 (17,5%)	58(9,5%)	186 (17,1%)
AA	8 (2,8%)	3 (0,5%)	57 (5,2%)
Total	285	609	1092

* Grupo controle II refere-se a controles da população brasileira.

**População geral do *1000 genomas*: Disponível em http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ Variation/Population?db=core;r=1:209959036- 209979465;v=rs2235371;vdb=variation;vf=1807176

Tabela XI. Análise estatística para o SNV rs2235371 utilizando o Teste de Fisher, comparando as freqüências genotípicas de afetados versus controles brasileiros e entre afetados versus controles da população geral do *1000 genomas.*

Populações comparadas / **Genótipos Comparados**	**Afetados x Grupo controle II***	**Afetados x Controles *1000 genomas*****
AA x GG	P= 0,0039	P= 0,0557
GA x GG	P= 0,0004	P= 0,5186
AA+GA x GG	P<0,0001	P= 0,2724

* Grupo controle II refere-se a controles da população brasileira.

** Controles *1000 genomas* refere-se à população geral deste banco de dados.

Para o SNV rs 2235371, foi verificada diferença estatisticamente significante entre os genótipos homozigotos (**AA**) (P= 0,0039), heterozigotos (**AG**) (P= 0,0004) e para a presença do alelo **A** no genótipo (p<0,0001), que foi mais freqüente entre afetados que em controles da população brasileira. Entretanto, estas diferenças não foram significantes ao compararmos os afetados com os controles da população geral do *1000 genomas.*

Segundo o banco de dados do *1000 genomas*, as freqüências alélicas para o SNV rs2235371 variam muito entre as diferentes etnias. O alelo **A** apresenta as maiores freqüências alélicas entre asiáticos (**A**: 41% x **G**:59%) e ameríndios (**A**: 14% x **G**: 86%) e menores freqüências alélicas entre europeus (**A**: 2% x **G**:98%) e africanos (**A**: 0% x **G**: 100%) (Tabela XII).

Tabela XII. Distribuição genotípica nos afetados e controles de diferentes grupos populacionais do *1000 genomas* para o SNV rs2235371.

Genótipos	**Afetados n(%)**	**Controles *1000 genomas***			
		AFR n(%)	**AMR n(%)**	**ASN n(%)**	**EUR n(%)**
GG	227 (79,7%)	245(99,6%)	138(76,2%)	101(35,3)	365(96,3)
GA	50 (17,5%)	1(0,4%)	35 (19,3%)	136 (47,6)	14(3,7%)
AA	8 (2,8%)	0 (0%)	8 (0,4%)	49 (17,1)	0 (0%)
Total	285	246	181	286	379

AFR: africanos; AMR: "mixed american"; ASN: leste-asiáticos; EUR: europeus. A população denominada "Mixed americans" inclui Colombianos, Porto-riquenhos e indivíduos de ancestralidade mexicana.

Realizamos a mesma análise estatística utilizando o Teste de Fisher comparando os afetados versus cada grupo populacional controle do *1000 genomas*, separadamente, e os resultados estão detalhados na Tabela XII:

Tabela XIII. Análise estatística para o SNV rs2235371 utilizando o Teste de Fisher comparando as freqüências genotípicas de afetados versus controles de diferentes grupos populacionais do *1000 genomas* (AFR, AMR, ASN e EUR).

Populações comparadas / **Genótipos Comparados**	**Afetados x Controles AFR**	**Afetados x Controles AMR**	**Afetados x Controles ASN**	**Afetados x Controles EUR**
AA x GG	P= 0,0031	P= 0,2337	P<0,0001	P= 0,0005
GA x GG	P<0,0001	P=0,3243	P<0,0001	P<0,0001
AA+GA x GG	P<0,0001	P=0,2247	P<0,0001	P<0,0001

AFR: africanos; AMR: "mixed american"; ASN: leste-asiáticos; EUR: europeus. A população denominada "Mixed americans" inclui Colombianos, Porto-riquenhos e indivíduos de ancestralidade mexicana.

Foi observada diferença estatisticamente significante entre as freqüências dos genótipos homozigoto **AA**, heterozigoto **GA** e para a presença do alelo **A** (**AA+GA**) versus o genótipo **GG**, ao compararmos o grupo de afetados e os grupos controles sas populações africanas (AFR) e européias (EUR), mostrando que o alelo menos comum (**A**) foi mais freqüente entre afetados que em controles das duas populações. Por outro lado, não foi observada diferença ao avaliarmos os mesmos quesitos entre os afetados versus a população "mixed americans" ou ameríndia (AMR). Interessantemente, ao comparamos os afetados com a população asiática (ASN), foi observada diferença significante, porém, nesse caso, o alelo menos comum (**A**) foi mais freqüente na população ASN que entre os afetados de nosso estudo (Tabela XIII).

Ainda, a fim de compararmos os nossos resultados com outro grupo controle formado por populações com etnias afro-americanas e euro-americanas, analisamos o banco de dados do ESP (*Exome Sequence Project 6500)*(Tabela XIV) e foi verificada diferença estatisticamente significante (P<0,0001), entre os genótipos homozigotos (**AA**), heterozigotos (**GA**) e os

genótipos com o alelo **A** (GA e AA) versus o genótipo **GG** quando comparamos os afetados com as duas populações de controles separadamente, sendo que o alelo menos comum (**A**) foi mais freqüente entre afetados que em controles. (Tabela XV)

Tabela XIV. Distribuição genotípica nos afetados e controles do banco de dado ESP para o SNV rs2235371.

Genótipos	Afetados n(%)	Controles ESP	
		Afro-americanos* n(%)	Euro-americanos* n(%)
GG	227 (79,7%)	2169 (98,5%)	4181 (97,2%)
GA	50 (17,5%)	34(1,5%)	119 (2,8%)
AA	8 (2,8%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	285	2203	4300

*Disponível em http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:209959036-209979465;v=rs2235371;vdb=variation;vf=1807176

Tabela XV. Análise estatística para o SNV rs2235371 utilizando o Teste de Fisher comparando as freqüências genotípicas de afetados versus controles de dois grupos de ancestralidade afro-americana e euro-americana do banco de dados *ESP*.

Populações comparadas / **Genótipos Comparados**	**Afetados x Controles Afro-americanos**	**Afetados x Controles Euro- americanos**
AA x GG	P<0,0001	P<0,0001
GA x GG	P<0,0001	P<0,0001
AA+GA x GG	P<0,0001	P<0,0001

b) rs2235375

A variante rs2235375 (c.667+27C>G) localizada no intron 6 foi encontrada em 102 dos 166 (61,5%) pacientes genotipados para esta variante. Deste total de 166 pacientes, 30 tinham FP e 136 FL±P e doas 102 pacientes portadores desta variante, 23 tinham FP e 79 FL±P. Logo, observou-se que 77% (23/30) dos indivíduos com FP e 58% (79/136) dos indivíduos com FL±P apresentaram esta variante. Por fim, destes 102 pacientes com o SNV rs2235375, obtivemos, em apenas 69 casos, informações detalhadas sobre os tipos de fissuras em seus

familiares. Verificou-se que 44 casos (63,8%) tinham padrão familiar de FL±P; 10 (14,5%) tinham padrão de FP e 15 (21,7%) segregavam os dois tipos de fissuras na família.

As freqüências alélicas, no locus rs2235375, dos afetados em nossa população estudada, dos controles brasileiros e dos controles do banco de dados do *1000 genomas* (http://www.1000genomes.org/) estão descritas na tabela VIII. Verificamos que a freqüência alélica do alelo **G** *(*alelo menos comum) foi de 40% nos afetados, 40% nos controles do *1000 genomas* e 37% nos controles brasileiros, valores aparentemente similares entre si.

Avaliando o banco de dados *do 1000 genomas*, as freqüências alélicas para o SNV rs2235375 não variam muito entre as diferentes etnias. O alelo **G** apresenta as maiores freqüências alélicas entre asiáticos (**G**: 57% x **C**:43%) e ameríndios (**G**: 44% x **C**: 56%) e menores freqüências alélicas entre europeus (**G:** 37% x **C**:63%) e africanos (**G**: 24% x **C**: 76%).

Para verificar se houve diferença estatística entre as classes genotípicas de afetados versus controles da população brasileira e entre afetados versus controles da população geral do *1000 genomas* foi aplicado o teste de Fisher (Tabela XVII). A distribuição genotípica nos afetados e controles para este SNV encontra-se na tabela XVI. Para o SNV rs2235375, não identificamos diferença estatisticamente significante entre os genótipos dos afetados em nenhum dos dois grupos controle avaliados.

Tabela XVI. Distribuição genotípica nos afetados e controles para o SNV rs2235375:

Genótipos	**Afetados n(%)**	**Controles grupo II n(%)**	**Controles *1000 genomas** n(%)**
CC	64 (38,5%)	241 (39,6%)	396(36,3%)
CG	70 (42,2%)	285 (46,8%)	509(46,6%)
GG	32 (19,3%)	83 (13,6%)	187(17,1%)
Total	166	609	1092

*Controles *1000 genomas*. População geral. Disponível em http://www.ensembl.org/Homo _sapiens/ Variation/Population?db=core;r=1:209965087-209966087;v=rs2235375;vdb=variation;vf=1807179

Tabela XVII. Análise estatística para o SNV rs2235375 utilizando o Teste de Fisher, comparando as freqüências genotípicas de afetados versus controles brasileiros e entre afetados versus controles da população geral do *1000 genomas.*

Populações comparadas / **Genótipos Comparados**	**Afetados x Grupo controle II***	**Afetados x Controles *1000 genomas*****
GG x CC	P= 0,0883	P= 0.4458
CG x CC	P= 0.3794	P= 0.2181
GG+CG x CC	P= 0.3995	P= 0.3126

* Grupo controle II refere-se a controles da população brasileira.

** Controles *1000 genomas* refere-se à população geral deste banco de dados.

c) rs2235373:

A variante rs2235373 (c.1060+37 C>T), localizada no íntron 7, associada a FL±PNS por Park et al. (2007) em uma população tailandesa, foi encontrada em nossa população em 105 os 285 pacientes (37%) genotipados para esta variante. Deste total de 285 pacientes, 61 tinham FP e 224 FL±P e dos 105 pacientes portadores desta variante, 23 tinham FP e 82 FL±P. Logo, observou-se que 37,7% (23/61) dos indivíduos com FP e 36,6% (82/224) dos indivíduos com FL±P apresentaram esta variante. Por fim, destes 105 pacientes com o SNV rs2235373, obtivemos, em apenas 71 casos, informações detalhadas sobre os tipos de fissuras em seus familiares. Verificou-se que 47 casos (66,2%) tinham padrão familiar de FL±P; 13 (18,3%) tinham padrão de FP e 11 (15,5%) segregavam os dois tipos de fissuras na família.

As freqüências alélicas, no locus rs2235373, dos afetados em nossa população estudada, dos controles brasileiros e dos controles do banco de dados do *1000 genomas* (http://www.1000genomes.org/) estão descritas na tabela VIII. Verificamos que a freqüência alélica do alelo **T** (alelo menos comum) foi de 22% nos afetados, similara à encontrada nos controles brasileiros (22,1%), porém, essa frequência alélica foi de 27% nos controles da população geral do *1000 genomas*, valor superior ao encontrado nos afetados.

Para verificar se houve diferença estatística entre as freqüências genotípicas de afetados versus controles da população brasileira (Grupo controle II) e de afetados versus controles da população geral do *1000 genomas,* foi aplicado o teste de Fisher (*Fisher's exact test***).** A distribuição genotípica nos afetados e controles para este SNV encontra-se na tabela XVIII e a análise estatística utilizando o Teste de Fisher encontra-se na tabela XIX.

Tabela XVIII. Distribuição genotípica nos afetados e controles para o SNV rs2235373.

Genótipos	**Afetados n(%)**	**Controles grupo II8 n(%)**	**Controles *1000 genomas**8 n(%)**
CC	180 (63%)	376(61,7%)	605 (5,4%)
CT	87 (30,5%)	197(32,3%)	385 (35,3%)
TT	18 (6,5%)	36(6%)	102 (9,3%)
Total	285	609	1092

* Grupo controle II refere-se a controles da população brasileira.

**População geral do *1000 genomas*. Disponível em http://www.ensembl.org/Homo_sapiens /Variation/Population?db=core;r=1:209963303-209964303;v=rs2235373;vdb=variation;vf=1807178

Tabela XIX. Análise estatística para o SNV rs2235373 utilizando o Teste de Fisher, comparando as freqüências genotípicas de afetados versus controles brasileiros e entre afetados versus controles da população geral do *1000 genomas*.

Populações comparadas / **Genótipos Comparados**	**Afetados x Controles grupo II***	**Afetados x Controles *1000 genomas*****
TT x CC	P= 0,4975	P= 0,0297
CT x CC	P= 0,3330	P= 0,0339
TT+CT xCC	P= 0,3702	P= 0,0108

* Grupo controle II refere-se a controles da população brasileira.

** Controles *1000 genomas* refere-se à população geral deste banco de dados.

Para o SNV rs 2235373, não foi verificada diferença estatisticamente significante entre os genótipos homozigotos (**AA**) (P= 0,4975), heterozigotos (**AG**) (P= 0,3330) e para a presença do alelo **T** (alelo menos comum) no genótipo (P=0,3702) ao compararmos os afetados versus os controles da população brasileira. Entretanto, estas diferenças foram significantes ao compararmos os afetados com os controles da população geral do *1000 genomas*,onde verificou-se que o alelo menos comum foi mais freqüente nos controles que nos afetados (P-valores variaram de 0,0339 a 0,0108 e estão descritos na tabela XIX).

Segundo o banco de dados do *1000 genomas*, as freqüências alélicas para o SNV rs2235373 variam muito entre as diferentes etnias. O alelo **T** apresenta as maiores freqüências

alélicas entre asiáticos (**T**: 48% x C:52%), e próximas entre ameríndios (**T**: 25% x **C**: 75%) e africanos (**T**: 20% x **C**: 80%) e menores freqüências alélicas entre europeus (**T**: 16% x **C:** 84%) (Tabela XX).

Tabela XX. Distribuição genotípica nos afetados e controles de diferentes grupos populacionais do *1000 genomas* para o SNV rs2235373.

Genótipos	**Afetados n(%)**	**Controles *1000 genomas***			
		AFR n(%)	**AMR n(%)**	**ASN n(%)**	**EUR n(%)**
CC	180 (63%)	154 (62,6%)	106(58,6%)	75(26,2%)	270(71,2%)
CT	87 (30,5%)	85 (34,6%)	58(32%)	147(51,4%)	95(25,1%)
TT	18 (6,5%)	7 (2,8%)	17 (9,4%)	64(22.4%)	14 (3,7%)
Total	285	246	181	286	379

AFR: africanos; AMR: "mixed american"; ASN: leste-asiáticos; EUR: europeus. A população denominada "Mixed americans" inclui Colombianos, Porto-riquenhos e indivíduos de ancestralidade mexicana.

Realizamos a mesma análise estatística, utilizando o Teste de Fisher, comparando os afetados versus cada grupo populacional controle do *1000 genomas*, separadamente. Os resultados da análise estão detalhados na Tabela XXI.

Tabela XXI. Análise estatística para o SNV rs2235373 utilizando o Teste de Fisher comparando as freqüências genotípicas de afetados versus controles de diferentes grupos populacionais do *1000 genomas* (AFR, AMR, ASN e EUR).

Populações comparadas / **Genótipos Comparados**	**Afetados x Controles AFR**	**Afetados x Controles AMR**	**Afetados x Controles ASN**	**Afetados x Controles EUR**
TT x CC	P= 0.0590	P= 0.1281	P<0,0001	P= 0.0537
CT x CC	P= 0.2700	P= 0.3119	P<0,0001	P= 0.0440
TT+CT x CC	P= 0.4829	P= 0.1853	P<0,0001	P= 0.0171

AFR: africanos; AMR: "mixed american"; ASN: leste-asiáticos; EUR: europeus. A população denominada "Mixed americans" inclui Colombianos, Porto-riquenhos e indivíduos de ancestralidade mexicana.

Não foi observada diferença estatisticamente significante entre as freqüências dos genótipos homozigoto **TT**, heterozigoto **CT** e para a presença do alelo **T** (**TT+CT**) versus o genótipo **CC**, ao compararmos o grupo de afetados versus os grupos controles sas populações africanas (AFR) e ameríndia (AMR). Por outro lado, foi observada diferença significante apenas para o heterozigoto **CT** versus o genótipo **CC**, ao compararmos os afetados versus a população européia (P= 0.0440), não sendo detectada essa associação nos homozigotos para o alelo menos comum (**T**). Interessantemente, ao comparamos os afetados com a população asiática (ASN), foi observada diferença significante, porém, nesse caso, o alelo menos comum foi mais freqüente na população ASN que entre os afetados de nosso estudo (Tabela XXI).

d) rs2235377:

Outra variante comum encontrada neste estudo, a SNV rs2235377 (c.-75-4A> G), localizada na região 5'UTR (no intron 1) a uma distância de 4 pb do sítio de splicing, foi associada com fissuras NS por alguns estudos (ZUCCHERO *et al.*, 2004; DIERCKS et al., 2009; SALAHSHOURIFAR et al, 2012), porém, ainda não é denominada como uma "SNV de suscetibilidade a fissuras". Este SNV foidetectado em 32 dos 168 pacientes (19%) genotipados para esta variante. Destes 32 pacientes, obtivemos, em apenas 21 casos, informações detalhadas sobre os tipos de fissuras em seus familiares. Verificou-se que 14 casos (66,7%) tinham padrão familiar de FL±P; 4(19%) tinham padrão de FP e 3 (14,3%) segregavam os dois tipos de fissuras na família.

Este SNV apresentou uma freqüência alélica de 11%, entre os afetados, para o alelo menos comum (G), valor inferior ao encontrado na população geral do grupo controle do *1000 genomas* (14%) e bastante superior ao encontrado nos controles da população brasileira (4,2%) (grupo controle II) (Tabela XXIIII).

Para verificar se houve diferença estatística entre as freqüências genotípicas de afetados versus controles da população brasileira (Grupo controle II) e de afetados versus controles da população geral do *1000 genomas*, foi aplicado o teste de Fisher (Tabela XXV). A distribuição genotípica nos afetados e controles para este SNV encontra-se na Tabela XXIIII.

Tabela XXIIII. Distribuição genotípica nos afetados e controles para o SNV rs2235377:

Genótipos	**Afetados n(%)**	**Grupo controle II* n(%)**	**Controles *1000 genomas*** n(%)**

AA	136 (81%)	233(97,9%)	849 (77,7%)
AG	28(16,6%)	0(0%)	186 (17,1%)
GG	4(2,4%)	5(2,1%)	57 (5,2)
Total	168	238	1092

* Grupo controle II refere-se a controles da população brasileira.

**População geral do *1000 genomas*. Disponível em http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation /Population?db=core;r=1:209974892-209975892;v=rs2235377;vdb=variation;vf=1807181

Tabela XXV. Análise estatística para o SNV rs2235377 utilizando o Teste de Fisher, comparando as freqüências genotípicas de afetados versus controles brasileiros e entre afetados versus controles da população geral do *1000 genomas*.

Populações comparadas / **Genótipos Comparados**	**Afetados x Grupo controle II***	**Afetados x Controles *1000 genomas*** **
GG x AA	P= 0,4424	P= 0,0697
AG x AA	P<0,0001	P= 0,4394
GG+AG x AA	P<0,0001	P= 0,2028

* Grupo controle II refere-se a controles da população brasileira.

** Controles *1000 genomas* refere-se à população geral deste banco de dados.

Para o SNV rs2235377, foi verificada diferença estatisticamente significante entre afetados e controles da população brasileira, onde o genótipo heterozigoto (**AG**) foi mais freqüente entre os afetados (P< 0.0001), porém essa associação não foi verificada para o genótipo homozigoto **GG** (P= 0,4424). Entretanto, estas diferenças não foram significantes ao compararmos os afetados com os controle da população geral do *1000 genomas* (P-valores estão descritos na Tabela XXV).

Avaliando o banco de dados *do 1000 genomas*, as freqüências alélicas para o SNV rs2235377 variam muito entre as diferentes etnias. O alelo **G** apresenta as maiores freqüências alélicas entre asiáticos (**G**: 41% x A:59%) e ameríndios (**G**: 14% x A: 86%) e é muito rara entre europeus (**G**:2% x **A**: 98%) e africanos (**G**: 0% x **A**: 100%) (Tabela XXVI):

Tabela XXVI. Distribuição genotípica nos afetados e controles de diferentes grupos populacionais do *1000 genomas* para o SNV rs2235377.

Genótipos	Afetados n(%)	Controles *1000 genomas*			
		AFR n(%)	AMR n(%)	ASN n(%)	EUR n(%)
AA	136 (81%)	245(99,6%)	138(76,2%)	101(35,3)	365(96,3)
AG	28(16,6%)	1(0,4%)	35 (19,3%)	136 (47,6)	14(3,7%)
GG	4(2,4%)	0 (0%)	8 (0,4%)	49 (17,1)	0 (0%)
Total	168	246	181	286	379

AFR: africanos; AMR: "mixed american"; ASN: leste-asiáticos; EUR: europeus. A população denominada "Mixed americans" inclui Colombianos, Porto-riquenhos e indivíduos de ancestralidade mexicana.

Realizamos a mesma análise estatística utilizando o Teste de Fisher comparando os genótipos dos afetados versus cada grupo populacional controle do *1000 genomas*, separadamente, e os resultados estão detalhados na Tabela XXVII:

Tabela XXVII. Análise estatística para o SNV rs2235377 utilizando o Teste de Fisher comparando as freqüências genotípicas de afetados versus controles de diferentes grupos populacionais do *1000 genomas* (AFR, AMR, ASN e EUR).

Populações comparadas / **Genótipos Comparados**	**Afetados x Controles AFR**	**Afetados x Controles AMR**	**Afetados x Controles ASN**	**Afetados x Controles EUR**
GG x AA	P= 0,0170	P= 0,2097	P <0.0001	P= 0,0057
AG x AA	P< 0.0001	P= 0,2734	P< 0.0001	P< 0.0001
GG +AG x AA	P< 0.0001	P= 0,1737	P< 0.0001	P< 0.0001

Foi observada diferença estatisticamente significante entre as freqüências dos genótipos homozigoto **GG**, heterozigoto **AG** e para a presença do alelo **G** (GG+AG) versus o genótipo **AA**, ao compararmos o grupo de afetados com os grupos controles das populações africanas (AFR). Na comparação com a população européia (EUR), essa diferença só foi significante entre os heterozigotos **AG** e para a presença do alelo **G** (**GG+AG**) versus o genótipo AA. Mostrando que o alelo menos comum (**G**) foi mais freqüente entre afetados que em controles

nas duas populações. Por outro lado, não foi observada diferença ao avaliarmos os mesmos quesitos entre os afetados versus a população ameríndia (AMR). Ainda, ao comparamos os afetados com a população asiática (ASN), foi observada diferença significante, porém, nesse caso, o alelo menos comum foi mais freqüente na população ASN que entre os afetados de nosso estudo (P-valores estão descritos na Tabela XXVII).

e) rs2013162, rs861019 e rs7552506:

Outras variantes como rs2013162, rs861019 e rs7552506, foram previamente associadas a FL+PNS em outros estudos, porém com resultados controversos.

A variante sinônima rs2013162 (c.459G>T; p.Ser153=), localizada no éxon 5, apresentou indícios de associação com FL±PNS em estudos realizados por Blanton et al. (2005), Scapoli et al.(2005) e Marazita et al. (2009). Este SNV foi encontrado em 104 dos 170 pacientes (61,2%) genotipados para esta variante. Destes 104 pacientes com o SNV rs2235371, obtivemos, em apenas 71casos, informações detalhadas sobre os tipos de fissuras em seus familiares. Verificou-se que 47 casos (66,2%) tinham padrão familiar de FL±P; 11 (15,5%) tinham padrão de FP e 13 (18,3%) segregavam os dois tipos de fissuras na família. Este SNV apresentou uma freqüência alélica de 40,6%, entre os afetados, para o alelo menos comum (**T**), valor próximo aos encontrados na população geral do grupo controle do *1000 genomas* (40%) e da população brasileira (36,9%) (grupo controle II).

As variante rs861019 (c.-73T>C), localizada na região 5'UTR (éxon 2) e rs7552506 (c.175-5 C>G), localizada no intron 3, próxima a sítio de splice do exon 4, foram associadas a FL±PNS em estudo realizado por Pegelow et al.(2008). O SNV rs861019 foi encontrado em 100 dos 168 pacientes (59,5%) genotipados para esta variante. Destes 100 pacientes com o SNV rs861019, obtivemos, em apenas 63 casos, informações detalhadas sobre os tipos de fissuras em seus familiares. Verificou-se que 41 casos (65%) tinham padrão familiar de FL±P; 11 (17,5%) tinham padrão de FP e 11 (17,5%) segregavam os dois tipos de fissuras na família. Este SNV apresentou uma freqüência alélica de 38%, entre os afetados, para o alelo menos comum (**C**), valor próximo aos encontrados na população geral do grupo controle do *1000 genomas* (40%) e da população brasileira (37,4%) (grupo controle II).

O SNV rs7552506 foi encontrado em 151 dos 293 pacientes (51,5%) genotipados para esta variante. Destes 151 pacientes com o SNV rs7552506, obtivemos, em apenas 94 casos, informações detalhadas sobre os tipos de fissuras em seus familiares. Verificou-se que 65 casos (69,2%) tinham padrão familiar de FL±P; 11 (11,7%) tinham padrão de FP e 18 (19,1%)

segregavam os dois tipos de fissuras na família. Este SNV apresentou uma freqüência alélica de 31%, entre os afetados, para o alelo menos comum (**G**), valor próximo aos encontrados na população geral do grupo controle do *1000 genomas* (27%) e da população brasileira (31,7%) (Grupo Controle II).

Para verificar se houve diferença estatística entre as frequências das classes genotípicas de afetados por estes SNV versus controles da população brasileira (Grupo controle II) e de afetados versus controles da população geral do *1000 genomas*, foi aplicado o teste de Fisher. As distribuições genotípicas nos afetados e controles para estes SNV encontram-se na tabela XXII e a análise estatística utilizando o Teste de Fisher encontra-se na tabela XXIII.

Tabela XXII. Distribuição genotípica nos afetados e controles para os SNV rs2013162, rs861019, rs7552506.

Genótipos	**Afetados n(%)**	**Controles grupo II* n(%)**	**Controles *1000 genomas*** n(%)**
rs2013162			
GG	66 (39%)	241(39,6%)	398 (36,4%)
GT	70 (41%)	286 (46,9%)	508 (46,5%)
TT	34 (20%)	82(13,5%)	186 (17%)
Total	170	609	1092
rs861019			
TT	68 (41%)	74(62,2%)	416 (38,1%)
TC	71 (42%)	1 (0,8%)	482 (44,1%)
CC	29 (17%)	44(37%)	194 (17,8%)
Total	**168**	119	1092
rs7552506			
CC	142 (48,5%)	288(47,3%)	596 (54,6%)
CG	122 (41,5%)	256 (42%)	413 (37,8%)
GG	29 (10%)	65 (10,7%)	83 (7,6%)
Total	293	609	1092

* Grupo controle II refere-se a controles da população brasileira.

**População geral do *1000 genomas*. Disponível em http://www.ensembl.org/ (variantes rs2013162; rs861019; rs7552506).

Tabela XXIII. Análise estatística para o SNV rs2013162, rs861019, rs7552506 utilizando o Teste de Fisher, comparando as freqüências genotípicas de afetados versus controles brasileiros e entre afetados versus controles da população geral do *1000 genomas*.

Populações comparadas / **Genótipos Comparados**		**Afetados x Grupo controle II***	**Afetados x Controles *1000 genomas*** **
rs2013162	**TT X GG**	P= 0,0610	P= 0,3751
	GT x GG	P= 0,3127	P= 0,1803
rs861019	**CC x TT**	P= 0,1601	P= 0,4022
	CT x TT	P<0,0001	P=0,3155
rs7552506	**CC x GG**	P= 0,3909	P= 0,0682
	GC x GG	P= 0,4402	P= 0,0701

* Grupo controle II refere-se a controles da população brasileira.

** Controles *1000 genomas* refere-se à população geral deste banco de dados.

Para as SNV rs2013162 e rs7552506, não foi observada diferença estatisticamente significante entre as frequências dos diferentes genótipos, comparando os afetados versus os controles da opulação geral do *1000 genomas* e dos controles brasileiros. Estes resultados sugerem que estas SNV não estão associados as FL±PNS na nossa amostra.

Por outro lado, ao realizarmos a mesma análise na variante rs861019, verificou-se uma diferença estatística entre as freqüências, apenas do genótipo heterozigoto, ao comparamos os afetados versus 119 controles da população brasileira. O mesmo não ocorreu na comparação com os controles da população geraldo *1000 genomas* (1092 indivíduos).

3.2.1.2. Variantes conhecidas raras:

Dentre as 26 variantes conhecidas, 8 foram consideradas *raras* (baseada nas freqüências alélicas no banco de dados do *1000 genomas*). Dentre estas 8, uma é reconhecida como causativa da SVW, o SNV rs28942093 (c.5C>T; p.Ala2Val), mutação *missense* localizada no exon 3, foi encontrada em heterozigose em um único caso dentre os 275 pacientes triados para os exons 3, 4 e 7 (0,36%). O paciente em questão apresenta FP completa e seu pai, também afetado, apresenta o mesmo fenótipo. Não foi encontrada nenhuma evidência de fossetas labiais no probando.

Dentre as outras 7 variantes conhecidas raras, 2 são mutações sinônimas encontradas em regiões codificantes: rs146068713 e rs116578701. As frequências alélicas de ambas as variantes não apresentaram diferença importante quando comparadas aos controles do *1000 genomas* (em diversas etnias) e aos controles brasileiros. Estas variantes não foram associada a FL±PNS por nenhum trabalho até a presente data.

- rs146068713 (c.366G>A; p.Ser122=), localizada no exon 4, foi encontrada em 1 paciente em heterozigose;
- rs116578701 (c.1059C>T; p.Ser353=), localizada no exon 7, também foi encontrada em 1 paciente em heterozigose.

As 5 variantes restantes, localizam-se em regiões não codificantes e não há não há descrição de associação destes SNV às FL±PNS na literatura até o momento:

- rs41304121 (c.380-106C>T), localizada no intron 4, e rs138771192 (c.1179+34T>C), localizada no íntron 8, foram encontradas em 1 paciente em heterozigose. As frequências alélicas de ambas as variantes não apresentaram diferenças importantes quando comparadas aos controles do *1000 genomas* (em diversas etnias) e aos controles brasileiros.
- rs145873101 (c.1179+68T>C), localizada no intron 8, foi encontrada em 3 pacientes (1 em heterozigose e 2 em homozigose); rs75012801 (c.*479T>G), localizada na região 3'UTR, foi encontrada em 3 pacientes em heterozigose. As frequências alélicas destas variantes foram discretamente superiores às dos controles.
- A variante rs116094279 (c.1061-301C>T), localizada no íntron 7, foi encontrada em heterozigose em 4/161 de nossos probandos com FL±P e familiares com o mesmo padrão de fissura, apresentando uma fequência alélica de 1,2% parao alelo menos comum (**T**). Este SNV não foi detectado em nenhum controle na população brasileira (1218 cromossomos do Grupo Controle II). Ao compararmos com a freqüência alélica do *1000 genomas*, observamos que este SNV tem uma freqüência de 1% no grupo de etnia africana no *1000 genomas* e menor nas demais etnias.

3.2.2. Variantes novas:

Todas as 9 variantes novas encontradas, são consideradas raras e, como já mencionado, nenhuma foi encontrada nos controles analisados. Não foi possível avaliar se estas variantes

representam mutações *de novo*, pois não dispomos do material genético dos pais destes indivíduos. Estes SNV foram encontrados em casos com FL±P (n=6) ou FP (n=4). É interessante observar, que apenas o SNV c.*293G>A foi recorrente em 2 pacientes não relacionados, ambos com FP (Tabela XIII).

Tabela XXVIII. Distribuição das variantes novas e tipos de fissuras associados.

Variantes	Identificação do paciente	Tipo de fissura	Tipo de fissura segregando na família	Total de pacientes com FP genotipados por variante	Total de pacientes com FL±P sequenciados para essa região
c.-304-109C>T	F2654-1	FL±P	?	32	131
c.-304-106A>C	F4523-1	FL±P	FL±P	32	131
c.-273G>C	F7321-1	FL±P	FL±P	32	131
c.-216G>A	F2680-1	FL±P	FL±P	32	131
c.-3-9C>T	F5209-1	FP	?	64	230
c.781G>A	F7810-1	FP	?	61	224
c.*199A>G	F4523-2	FL±P	FL±P	32	135
c.*293G>A	F2668-1 F3460-1	FP FP	FP ?	30	131
c.*382T>C	F6505-1	FL±P	FL±P e FP	30	131

A única alteração não sinônima encontrada, o SNV c.781G>A, localiza-se no éxon 7, no domínio de ligação à proteína, levando a uma mudança de aminoácido p.(Asp261Asn). Esta alteração foi considerada como neutra, tolerada e benigna por meio da análise *in silico* com os softwares *Provean, SIFT e Poliphen*. Porém, a análise com os softwares *fast-SNP* e *SNP-nexus*, mostrou a predição de alteração do sítio de ligação com o fator de transcrição *PAX2* e de alterção de sítios conservados em vertebrados.

Todas as outras variantes novas estão localizadas em regiões não codificadoras. A análise *in silico* das variantes c.-3-9C>T (no íntron 2) e c.*199A>G (na região 3'UTR do *IRF6)* não previu nenhum possível efeito funcional. Já para as outras 6 variantes, verificou-se que 4 delas (c.-304-109C>T; c.-304-106A>C; c.-273G>C; c.-216G>A) estão localizadas em ilhas CpG, e portanto a substituição de nucleotídeo pode levar à alteração do controle de regulação por metilação e, conseqüentemente, da regulação da transcrição, por exemplo. Ainda, duas delas parecem levar a alteração de controle de "splicing" (c.-273G>C, c.*382T>C) e, em duas outras (c.-216G>A e c.*293G>A), há a predição de interferência em sítio de ligação de fatores de transcrição, como o *MZF1* e *RORα1* respectivamente. Os SNV c.-273G>C,

c.*293G>A localizam-se em regiões genômicas bem conservadas entre os vertebrados, (baseadas em múltiplos alinhamentos de 44/46 espécies de vertebrados utilizados pelo programa *SNP-nexus*) (SIEPEL *et al*., 2005). Nota-se que, algumas destas variantes podem interferir no controle de regulação do *IRF6* por mais de um mecanismo.

3.3. Análise das variantes do *IRF6 n*a população controle:

Ao avaliarmos a população do Grupo Controle II, considerando a mesma extensão genômica avaliada na população de pacientes (g.209979663-209961243), foram detectadas 93 SNV e verificamos a seguinte distribuição destas variantes ao longo do *IRF6* (Tabela XXIX):

Tabela XXIX. Distribuição de diferentes SNV encontradas no grupo controle II ao longo do *IRF6*.

Região gênica	Total de variantes	Conhecidas	Novas
Não codificante			
Upstream	4 (4,3%)	3	1
5'UTR	5 (5,4%)	2	3
Intrônicas*	68 (73,1%)	37	31
3'UTR	5 (5,4%)	4	1
Codificante			
Exônicas sinônimas	6 (6,45%)	5	1
Exônicas não sinônimas	5 (5,4%)	1	4
Total	93 (100%)	52 (55,9%)	45 (44,1%)

*Foram excluídas da análise do padrão de distribuição das variantes entre controles e afetados, pois suspeitamos que haja um excesso de falsos-positivos em função da metodologia utilizada.

Dentre as 93 variantes encontradas no Grupo Controle II, 41 foram consideradas novas após busca nos bancos de dados do *dbSNP*, *ESP-Exome Sequence Project 6500* (http://evs.gs.washington.edu/EVS/) e *1000 genomas* (http://www.1000genomes.org/) e 52 conhecidas.

Entre os afetados, observamos que a distribuição de variantes ao longo do *IRF6* foi a seguinte: 22,9% em regiões codificantes (8/35); 14,2% na região upstream ao gene (5/35); 22,9% na região 5'UTR (8/35); 20% em região intrônica (7/35); 20% em região 3'UTR (7/35).

A fim de comparar a distribuição das variantes nas diferentes regiões gênicas entre afetados e controles, realizamos o Teste de Fisher (Tabela XXX). O teste mostrou que houve excesso de

variantes detectadas nas regiões 5'UTR e na região "Upstream+5'UTR" (avaliadas em conjunto) quando comparados aos Grupo Controle II (P<0,0001).

Tabela XXX. Distribuição das variantes nas regiões reguladoras (*upstream*, 5'UTR, e 3'UTR) entre afetados e controles.

Região reguladora	Afetados		Grupo controle II		Teste de Fisher
	Com mutação	Sem mutação	Com Mutação	Sem mutação	
Upstream*	102	61	147	100	P=0,3026
5'UTR **	139	18	104	212	P<0,0001
Upstream+5'UTR***	153	4	192	93	P<0,0001
3'UTR	32	129	41	173	P=0,4818

*Região upstream: inclui uma extensão de 143pb upstream ao primeiro nucleotídeo do exon 1.

**Região 5'UTR: as regiões amplificadas em nosso seqüenciamento consideradas como parte da reião 5'UTR, incluem o exon 1 e 2 e as regiões intrônicas flanquedoras correspondentes (100pb subseqüentes ao exon1 + 136pb antecedentes ao exon 2 + 220pb subseqüentes ao exon 2), além de uma extensão de 52pb antecedentes inicio do exon 3).

***Região upstream+5'UTR: refere-se à região 5'UTR somada à região upstream.

4. Discussão:

Ao estebelecermos uma comparação entre o presente trabalho com o estudo anterior de nosso grupo desenvolvido por Jehee et al (2009), é possível verificar que analisamos um número amostral superior de fissurados procedentes de 5 regiões brasileiras, sendo assim mais representativa da população de nosso país. Ainda, fizemos a triagem exônica completa do *IRF6*, não apenas dos exons 3,4 e 7 como feito por Jehee et al. (2009).

No presente trabalho, analisamos uma amostra de 304 indivíduos com história familial de fissura, onde 78,4% dos probandos têm FL±P e 21,6% dos probandos têm FP. Em 185 casos, foi possível determinar o tipo específico de fissuras que acometiam os familiares. Consequentemente, detectamos que em 29 famílias (15,7%) os dois tipos de fissuras segregavam concomitantemente, o que não corrobora os dados da literatura que sugerem que, geralmente, há segregação do mesmo subtipo de fissura em uma mesma família e exceções a esta regra são observadas principalmente em algumas formas sndrômicas (KOT & KRUK-JEROMINI, 2007; RUTLEDGE *et al.*, 2010).

Pelo menos, 275 pacientes foram analisados para os exons 3, 4 e 7 do *IRF6* e 150 pacientes para todos os exons codificantes.

Dentre os 35 SNV encontrados, 26 (74,3%) são conhecidas, (8 raras e 18 comuns), e 9 (25,7%) são variantes novas e raras. Destes 35 SNV, 5 são sinônimos, 3 são *missense* e 27 localizam-se em regiões não codificantes. Enquanto as mutações sinônimas foram encontradas nos exons 4, 5, 7 e 8, as mutações *missense* só foram encontradas nos exons 3 e 7.

4.1. Relação entre os SNV e o fenótipo:

4.1.1. Variantes raras:

Foram encontradas 17 variantes raras nos indivíduos afetados, 8 conhecidas e 9 novas.

4.1.1.1. Variantes raras conhecidas:

Dentre as 8 variantes raras conhecidas, a rs28942093 é reconhecida como causativa da SVW e será discutida separadamente abaixo.

Em relação às outras 7 variantes, tanto as 2 variantes sinônimas encontradas nos exons 4 e 7 (rs146068713; rs116578701), quanto 4 variantes situadas em regiões não codificantes (rs41304121 no intron 4; rs138771192 e rs145873101 no íntron 8; rs75012801 na região 3'UTR), não apresentaram diferenças significativas nas frequências alélicas quando comparadas aos controles de diversas etnias e não foram associadas a FL±PNS por nenhum trabalho até a presente data.

Merece destaque, contudo, a variante intrônica rs116094279 encontrada em 4/157 de nossos probandos (freqüência alélica de 1,2% para o alelo meno comum) e em nenhum controle na população brasileira. Todos os 4 pacientes apresentavam FL±P e segregavam apenas FL±P em suas famílias. Observamos que este SNV tem uma freqüência de 1% no grupo de etnia africana no *1000 genomas* e menor nas demais etnias. Este SNV, nunca antes associado a FL±P, merece ser melhor avaliado e um estudo incluindo a análise de ancestralidade será importante para melhor avaliar sua relação com a predisposição a FL±PNS. Além disso, por ser uma variante intrônica, existe a possibilidade da técnica utilizada no sequenciamento dos controles brasileiros do Grupo Controle II (seqüenciamento de exoma em larga escala) não ter coberto o locus desta variante, impossibilitando a sua detecção dente grupo, o que causaria esta ausência nos controles.

4.1.1.2. Variantes raras reconhecidamente patogênicas:

A única mutação classificada como patogênica na nossa amostra, foi a mutação *missense* rs28942093, causada por uma troca de C> T na posição 5 do exon 3, levando a uma troca de Ala por Val no códon 2 da proteína *IRF6*, afetando o seu domínio de ligação ao DNA (Kondo *et al.*, 2002). Esta mutação, muito possivelmente, leva à perda de função do *IRF6*, diminuindo sua capacidade de interação com o DNA. A mutação em heterozigose foi encontrada em um caso familial entre os 275 probandos triados para os exons 3, 4 e 7. O probando e seu pai, único fissurado entre os familiares, apresentam FP completa. Não foi encontrada nenhuma evidência de fossetas labiais no probando, porém os demais familiares não foram avaliados clinicamente, o que corresponde a uma pendência em nossa avaliação clínica. Essa mutação foi descrita, inicialmente, em uma família com quadro típico de SVW (KONDO *et al.*, 2002). Wang *et al.*, (2003) encontraram a mesma mutação em uma família onde os indivíduos também segregavam apenas FP, FP submucosa, úvula bífida ou apenas fossetas labiais bilaterais, característicos da SVW. Assim sendo, podemos considerar o presente caso como uma forma de SVW, onde não houve penetrância de fossetas labiais.

Desta forma, a frequência de mutações patogênicas raras no *IRF6* na presente amostra foi estimada em 0,36%, considerando os 275 probandos triados para os exons 3, 4 e 7.

Em um estudo anterior do nosso grupo que consistiu na análise dos exons 3, 4 e 7 do *IRF6* em 108 casos familiais de FL±P classificados a priori como NS, observamos que cerca de 3% das famílias com pelo menos dois indivíduos com FL±PNS eram portadores de mutações patogênicas ou potencialmente patogênicas no *IRF6* (JEHEE *et al.*, 2009). Das 3 mutações detectadas, 1 já havia sido descrita para a SVW (o SNV CM044897 (Arg9Trp) localizado no exon 3 descrito por MATSUZAWA *et al.*, 2004), e duas outras novas variantes com significado clínico ainda não estabelecido: Gln17Pro (c.50A>C) e Val113Leu (c.337G>C). Observamos ainda que estas duas novas mutações não constam dos bancos de dados atuais como causadoras da SVW.

O maior número de mutações possivelmente patogênicas observadas em Jehee *et al.* (2009) pode, em parte, estar relacionado ao maior número de afetados naquelas famílias, que variou de 1 a 11 afetados/família. Em nossa população esse valor variou de 1 a 7 afetados/família. Uma outra possibilidade é que estas pequenas diferenças estejam relacionadas ao tamanho amostral.

Uma análise combinada das amostras de Jehee *et al.*, com a amostra do presente estudo, resulta numa frequência de 4 mutações raras patogênicas em 383 casos familiais de FL±PNS e FPNS seqüenciados para os exons 3,4 e 7, o que equivale 1% das casos. Uma frequência de 1% explicaria a falta de sucesso relatada por outros grupos que triaram o *IRF6* em um número relativamente pequeno de casos com FL±PNS. Zucchero *et al.* (2004) não encontraram mutações patogênicas em 160 famílias, entretanto, em sua população, não está claro a freqüência de casos familiais. Pegelow *et al.*, (2008) usou a mesma abordagem para 17 famílias com recorrência familial na Suécia, não encontrando mutações patogênicas. Birnbaum *et al.* (2008) avaliou 63 famílias alemãs com recorrência familial, detectando duas mutações consideradas patogênicas em dois probandos, que descobriu-se posteriormente terem sido submetidos a ressecção cirúrgica prévia das fossetas labiais. Recentemente, Larrabee *et al.* (2011), avaliaram 100 famílias em Honduras, Salahshourifar *et al.*, (2012) triaram 39 indivíduos na Malásia e Chou *et al.* (2013) avaliaram 44 indivíduos em Taiwan, com recorrência familial, contudo nenhum estudo encontrou mutações patogênicas no *IRF6.*

Da nossa casuística combinada (1 caso do presente estudo e 3 no estudo de Jehee *et al.,(2009*)), observa-se que um propósito tinha FP (presente estudo) e os outros 3 FL±P; 3 destas 4 famílias tinha um parente afetado com um tipo de fissura diferente. Rutledge *et al.*, (2010) avaliaram duas famílias que segregavam FL±P e FP, classificadas como NS, detectando duas mutações *missense* consideradas patogênicas: Phe369Ser (1106T>C) no exon 8 e a variante nova Met1Leu (1A>C) no exon 3, corroborando a nossa sugestão de que um dos critérios para a triagem para mutações no *IRF6* é que sejam incluídos casos familiais com fissuras mistas.

Em um dos nossos 4 pacientes com fissuras, verificou-se uma alteração labial, que poderia ser uma forma frustra de pit. Esta mutação (Arg9Trp) já havia sido descrita para a SVW por Matsuzawa *et al.*, (2004) em uma família também com fossetas labiais atípicas. Desmyter *et al.*, (2010) avaliaram 95 indivíduos europeus com FL±PNS com recorrência familial, e encontraram 3 indivíduos com mutações patogênicas no *IRF6*, entretanto, ao serem reavaliados, detectou-se a presença de fossetas labiais atípicas. Portanto, uma outra sugestão é o estudo do *IRF6* quando houver dúvidas em relação ao exame clínico das fossetas labiais.

4.1.1.3. Variantes raras novas:

Todas as variantes novas foram consideradas raras, uma vez que foram encontradas na população de afetados com uma frequência < 1% e não foram encontradas nos controles. Dentre as 9 variantes novas encontradas, apenas 1 está em região codificante no exon 7; 2 estão "upstream" ao *IRF6*; 3 estão em região 5'UTR e 3 na região 3'UTR.

As análises *in silico* sugeriram que 8 das 9 variantes novas podem estar interferindo no controle de expressão do *IRF6*. Ainda, quatro variantes parecem alterar sítios de ligação a fatores de transcrição, alterando a ligação ao *MZF1(*c.-216G>A; c.-3-9C>T), ao *RORα1* (c.*293G>A) e ao *PAX2 (*c.781G>A).

O *MZF1* (*myeloid zinc finger gene*) parece estar associado a funções de supressão tumoral nas células hematopoiéticas (HROMAS *et al.,* 1996; GABOLI *et al.,* 2001), enquanto o *RORα* (*Retinoid-related orphan receptor alpha*) regula um amplo espectro de genes expressos em vários tecidos, porém ainda não se conhece a função precisa deste receptor-órfão (DELERIVE *et al.,* 2001), entretanto alguns estudos mostram que este gene esteja relacionado com desenvolvimento do sistema nervoso central (HAMILTON *et al.,* 1996; DUSSAULT *et al.,* 1998; STEINMAYR *et al.,* 1998). O *PAX2* (*paired box gene 2*) parece ser um alvo de supressão transcricional pelo gene supressor de tumor *WT1* (*wingless-type MMTV integration site family, member 1*).

Para avaliarmos a interação entre os genes *IRF6* e *PAX2*, os dados foram analisados com o uso do software *IPA* (*Ingenuity Pathway Analysis). Os resultados preliminares sugeriram que os genes* ambos parecem exercer um papel na etiologia das anomalias craniofaciais, porém o *PAX2* é relacionado com a exencefalia e *IRF6* com fissuras orais, SVW e SPP. Os quatro genes *MZF1, RORα, PAX2, IRF6* parecem estar envolvidos na etiologia de carcinomas. Esses genes, até o momento não estão diretamente relacionados entre si e nem todos apresentam envolvimento com o desenvolvimento crânio-facial, porém, não podemos descartar essa possibilidade, pois alguns trabalhos relacionam genes supressores de tumor com etiologia de fissuras (KOBAYASHI *et al.,* 2013) e os quatro genes *MZF1, RORα, PAX2, IRF6* sugerem envolvimento na etiologia de tumores.

4.1.2. Variantes comuns:

Dentre as 35 SNV encontradas, 18 foram consideradas comuns e todas são conhecidas previamente: 4 localizam-se em regiões codificantes e 14 em regiões não codficantes. Dentre

os 18 SNV comuns, os SNV rs2235371 e rs2235375 são associadas com o fenótipo "Orofacial cleft 6, susceptibility to" (OFC6; MIM 608864) (ZUCCHERO et al, 2004; SCAPOLI et al, 2005).

a) rs2235371:

Ao avaliarmos o SNV rs2235371 (c.820G>A; p.Val274Ile) na presente amostra, não observamos diferença estatistica entre as freqüências genotípicas dos afetados versus controles da população geral do *1000 genomas.* Este resultado foi similar ao encontrado por Paranaiba et al., (2010) em estudo realizado na população brasileira, que não observou associação entre este SNV e FL±PNS.

Entretanto, comparando os afetados com controles da população brasileira, observamos diferença estatisticamente significante entre as frequências genotípicas dos dois grupos, mostrando a maior freqüência do alelo **A** (*alelo menos comum*) entre os afetados por fissuras. Estes resultados podem sugerir associação entre o alelo A e a predisposição às formas familiais de fissuras orais em nossa população brasileira, sendo que esta associação foi observada tanto nas famílias com FL±P ou com FP.

Paradoxalmente, em estudo de associação realizado por Zucchero, *et al.* (2004) que avaliou o SNV rs2235371 em uma população de afetados por FL±PNS de ancestralidade asiática e sul-americana, o alelo associado com o risco de FL±PNS não foi o **A** (274Ile), e sim o **G** (274Val). Foi demonstrado associação significante entre o alelo **G** (alelo mais comum) e FL±PNS através da detecção do excesso de transmissão deste alelo dos pais para os filhos afetados por FL±P e da demonstração que indivíduos heterozigotos para este polimorfismo (genótipo **GA**) tinham um menor risco de recorrência de FL±P que indivíduos homozigotos GG. Outros trabalhos que corroboraram os achados de Zucchero et al (2004), como o estudo realizado por Srichomthong et al, (2005) em indivíduos tailandeses; por Letra et al (2012), em uma população brasileira, por Larrabbe et al (2011) em uma população de Honduras. Curiosamente, o alelo **G** é o alelo mais comum e evolutivamente conservado em várias espécies. Alguns estudos ainda supõem que alelo **A** desenvolveu-se tardiamente como um alelo de proteção contra FL±P (LARRABEE et al, 2011).

Na tentativa de esclarecer a base desses achados divergentes, foi realizada uma análise das freqüências dos diferentes genótipos, comparando os afetados com controles dos diferentes grupos populacionais do banco de dados do *1000 genomas e do ESP (Exome Sequence Project 6500).* A análise encontrou uma diferença estatisticamente significante (P<0,0031) na

comparação dos afetados versus grupos populacionais controles de ancestralidade africana e européias (do *1000 genomas*) e afro-americanas e euro-americanas (do ESP), corroborando os achados da comparação dos afetados versus controles brasileiros. Por outro lado, não foi observada diferença significante (P≥0,2337) entre os afetados e a população ameríndia, resultado semelhante à comparação com a população geral do *1000 genomas* e com o achado de Paranaíba et al, 2010.

Ao comparamos os afetados com a população asiática (asiáticos orientais), foi observada diferença (P<0,0001), porém neste caso, o alelo menos comum (**A**) foi mais freqüente na população asiática que entre os afetados de nosso estudo.

Um fator que pode ter contribuído para estes resultados discordantes é que a nossa amostra esteja enriquecida com casos familiais. Outra possibilidade é que os nossos resultados estejam enriquecidos com afetados de ancestralidade com origem ameríndia, sendo necessária uma correção para estratificação populacional para melhor avaliarmos os achados.

Sabe-se que as freqüências alélicas para o SNV rs2235371 variam muito entre as diferentes etnias, sendo que o alelo menos comum (**A**), apresenta as maiores freqüências entre asiáticos, seguido por ameríndios e menores freqüências entre europeus e africanos. A alta freqüência do alelo ***G,*** considerado de risco para fissuras pela maioria dos trabalhos realizados, principalmente nas populações controle européias e africanas, tornam este alelo como um candidato pouco provável para ser considerado um agente causativo das fissuras NS. Tais dados mostram ser pouco plausível que o SNV rs2235371, seja causal isoladamente, e sugerem que esta variante esteja em desequilíbrio de ligação com outro loco (ou variante) que, de fato, contribua para a ocorrência das fissuras, já que este SNV localiza-se em um bloco de desequilíbrio de ligação de 140Kb de extensão (ZUCCHERO et al, 2004; RAHIMOV et al, 2008).

Pan et al. (2010) avaliaram conjuntamente os SNV rs 2235371e rs642961 (localizado em uma região do *IRF6* não incluída em nosso estudo) em uma população chinesa com fissuras NS e encontrou associação entre os SNV e FL±PNS. Rahimov et al. (2008) concluiram que a associação repetida deste SNV com FL±PNS é causada por um desequilíbrio de ligação entre rs642961 e rs2235371 e que o rs642961, uma suposta mutação funcional em um sítio de ligação de DNA AP-2α na região promotora do *IRF6*, é uma variante causal isolada em populações européias. Birnbaum, porém, detectou que o Alelo **G** (274Val) apresentou associação com FL±P, independentemente do SNV rs642961. Logo, estes resultados ainda são conflituosos.

Estes resultados sugerem que estudos adicionais sejam realizados em nossa população avaliando a relação do SNV rs2235371 com o rs642961, que os controles da população brasileira sejam reavaliados ou tenham seu número amostral aumentado e que as populações de controles brasileiros e de afetados sejam submetidos a uma análise de ancestralidade.

b) rs2235375:

Em relação ao SNV rs2235375 (c.667+27C>G), observamos uma frequência alélica de 40% para o alelo menos comum (**G**), valor similar ao encontrado nos controles do *1000 genomas* e nos controle brasileiros (37% em 1218 cromossomos da população brasileira). Estes resultados não sugerem, portanto, associação entre este SNV e fissura lábio palatina na nossa população. Assim, não corrobora os resultados obtidos por Scapoli *et al.*,. (2005) que detectou, em uma população italiana, evidências de associação do SNV de rs2235375 e FL±P, onde ocorria um excesso de transmissão do alelo comum para os indivíduos afetados por fissuras.

c) rs2235373:

A variante rs2235373 (c.1060+37 C>T), foi associada a FL±PNS por Park et al. (2007) em uma população tailandesa. Entre nossos probando, foi encontrada em 37% dos casos com entre afetados por FL±P e FP. Verificamos, diferenças significantes ao compararmos os afetados com os controles da população geral do *1000 genomas. O* alelo menos comum foi mais freqüente nos controles que nos afetados (P-valores variaram de 0,0339 a 0,0108), entretanto, não foi verificada diferença ao compraramos os afetados com os controles brasileiros. Para melhor esclarecer estes resultados, avaliamos as diferentes populações de controles do *1000 genomas*. Não verificamos diferença estatisticamente significante entre os afetados e a população controle africana e ameríndia, entretanto, uma diferença significante exclusivamente para os heterozigotos foi detectada, ao compararmos os afetados versus a população européia (P=0,0440). Na comparação com a população asiática (ASN), foi observada diferença significante, porém, nesse caso, o alelo menos comum (**T**) foi mais freqüente na população ASN que entre os afetados de nosso estudo. Estes achados também podem ser atribuídos a estratificação populacional e estudos de ancestralidade podem contribuir no esclarecimento destas diferenças.

d) rs2235377:

A SNV rs2235377 (c.-75-4 A>G) mostrou evidências de associação com fissuras NS na presente amostra, na qual a frequência alélica do alelo menos comum (**G)** foi de 11% na amostra de afetados e de apenas 4,2% nos controles brasileiros. O genótipo heterozigoto (AG) foi mais freqüente entre os afetados (p< 0.0001), porém essa associação não foi verificada para o genótipo homozigoto GG (P=0.4424). Esse diferença não foi confirmada ao compararmos os afetados com os controle da população geral do *1000 genomas*, que apresentaram uma freqüência alélica para o alelo **G** de 14%. Ao analisarmos as supopulações africanas e européias do *1000 genomas*, verificou-se uma diferença significante , mostrando que o alelo menos comum (**G**) foi mais freqüente entre afetados que em controles nas duas populações. Por outro lado, não foi observada diferença ao avaliarmos a população ameríndia. Como ocorrido para outras SNV, o alelo menos comum (**G**) foi mais freqüente na população asiática que entre os afetados de nosso estudo. Em um estudo de associação entre variantes do *IRF6* e fissuras orais, a maior significância estatística e maior grau de transmissão foi observada entre indivíduos de ancestralidade asiática para este SNV (ZUCCHERO et al, 2004). Diercks et al, (2009) também verificaram associação deste SNV com FL±PNS em uma populaçao de Honduras. Zucchero *et al.* (2004) ainda sugeriram que esta variante pode ter um efeito sobre o splicing, no entanto, análises funcionais são necessárias para caracterizar este papel e estudos de ancestralidade são necessários para melhor caracterizar nossos pacientes e controles brasileiros.

e) rs2013162, rs861019 e rs7552506:

Outras variantes comuns como, rs2013162, rs861019 e rs7552506 também foram previamente associadas a FL+PNS em outros estudos, porém com resultados controversos (BLANTON et al.,. 2005 , SCAPOLI et al , 2005, MARAZITA et al, 2009. PEGELOW, 2008.).

Não foi observada associação das variantes rs2013162 e rs7552506 com fissuras em nossa amostra de afetados. Entretanto, ao avaliarmos a SNV rs861019, verificou-se uma diferença estatística significante (p<0,0001) entre as frequências do genótipo heterozigoto entre os afetados e os controles brasileiros. Provavelmente, essa diferença é atribuível ao pequeno tamanho amostral (119 indivíduos) deste grupo controle brasileiro genotipado para esta SNV,

pois a diferença não foi encontrada para o genótipo homozigoto e na comparação com o grupo controle do *1000 genomas*, formado por 1092 indivíduos, um tamanho amostral considerável. Estes resultados sugerem que estes SNV não estão associados as FL±PNS na nossa amostra.

4.2. Número total de SNV e sua distribuição:

Apesar das metodologias serem diferentes, comparamos as proporções de variantes conhecidas e novas encontradas entre os afetados e controles brasileiros do Grupo II. A proporção de variantes novas nos controles (44,1%) foi maior do que entre os afetados (25,7%). Observa-se que a maioria destas variantes novas estão localizadas nas regiões intrônicas. Uma melhor avaliação das variantes observadas no grupo dos controles deverá ser realizada antes de elaborarmos qualquer conclusão, uma vez que podem estar relacionadas a falsos positivos em função da metodologia usada (sequenciamento de nova geração) no sequenciamento das amostras do Grupo Controle II.

Observamos que a maioria das variantes, tanto na no grupo de afetados quanto no Grupo Controle II, localizam-se em regiões não codificadoras, o que é o esperado, uma vez que as regiões intrônicas estão sob menor pressão seletiva. A distribuição das variantes nas regiões reguladoras (upstream, 5'UTR, e 3'UTR) e regiões codificadoras foram comparadas e verificou-se uma diferença significante ($P<0,0001$) nas duas amostras, particularmente devido a uma maior frequência de variantes na região 5'UTR nos afetados. Estes resultados preliminares sugerem, portanto um pequeno excesso de variantes na região 5'UTR nos afetados.

5. Considerações finais e Conclusões:

Estimativas de risco de recorrência para a prole de um paciente afetado por fissura dependem da definição dos mecanismos etiológicos da doença, evidenciando a importância de usar ferramentas apropriadas, juntamente com a avaliação clínica, para o estabelecimento do diagnóstico.

A avaliação de nossos resultados sugere que a triagem do *IRF6* seja indicada de forma criteriosa, para os casos de fissurados com história familial de fissura, famílias segregando FP e FL±P concomitantemente ou presença de fossetas labiais atípicas ou duvidosas.

A triagem dos outros exons além do 3,4 e 7 não pareceu ser relevante para a detecção de variantes raras de perda de função associadas às fissuras na SVW, uma vez que apenas 1

mutação potencialmente patogênica foi identificada no exon 3, um dos exons mais freqüentemente envolvidos na detecção de mutações na SVW.

A análise combinada dos resultados dos estudos de triagem do *IRF6* realizados por nosso grupo (presente estudo e Jehee et al., 2009) sugerem que a frequência de variantes raras patogênicas, ou formas frustras de SVW entre casos NS é ~1%. A maior freqüência de mutações possivelmente patogênicas observadas no estudo de Jehee et al. (2009), pode ser explicada pelo maior agregação de indivíduos afetados naquelas famílias. Por outro lado, a falta de sucesso de outros estudos, em encontrar mutações patogênicas pode ser atribuido aos seus menores tamanhos amostrais.

Variantes raras novas foram encontradas em ~3,3% dos afetados e em nenhum dos controles brasileiros e a maioria destas variantes parecem estar interferindo no controle de expressão do *IRF6*. Os resultados preliminares dos estudos *in silico* funcionais juntamente com um discreto aumento da prevalência das variantes na região 5'UTR sugerem um possível envolvimento destes SNV na predisposição das formas familiais de FL±P e FP NS, porém estudos funcionais adicionais são necessários para esclarecer esse efeito.

Maiores estudos serão necessários para avaliar a relação de algumas variantes raras associadas com predisposição a fissuras em nossa amostra de afetados, como a SNV intrônica rs116094279. Quanto às variantes comuns, alguns resultados divergentes da literatura foram encontrados em nosso estudo: 1) Observou-se uma possível associação entre o alelo A (c.820A; p.274I) da SNV rs2235371 e fissuras, resultado contrário ao encontrado na maioria dos estudos anteriores que associam o alelo G (c.820G; p.274V) a essas malformações; 2) Não detectou-se associação entre o SNV rs2235375 (associadas com o fenótipo "Orofacial cleft 6, susceptibility to") (MIM 608864) e pacientes fissurados em nossa população; 3) Por outro lado, os SNV rs2235377 e rs2235373, menos conhecidos por sua associação com fissuras, mostraram evidências de associação na presente amostra. Os resultados de análises de associação são preliminares, pois não foi feita uma correção para a ancestralidade dos grupo de afetados e de controles brasileiros analisados neste trabalho. Este estudo pode contribuir para o conhecimento da etiologia das fissuras e auxiliar na identificação de características herdadas que levam a um aumento da suscetibilidade individual no distúrbio multifatorial que representa as fissuras NS.

Referências bibliográficas:

ADAM SIEPEL. *et al.* Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res*, 15: 1034-1050, 2005.

BEN, J.; JABS, E. W.; CHONG, S. S. Genomic, cDNA and embryonic expression analysis of zebrafish *IRF6*, the gene mutated in the human oral clefting disorders Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Gene Expression Patterns*, 5 (5): 629–638, 2005.

BENDER, P.L. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs*, 15 (4): 242-9, 2000.

BIRNBAUM, S. *et al*. Mutation screening in the *IRF6*-gene in patients with apparently nonsyndromic orofacial clefts and a positive family history suggestive of autosomal-dominant inheritance. *Am J Med Genet Part A*, 146A: 787–790, 2008.

BLANTON, S. *et al.* Variation in *IRF6* contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *American Journal of Medical Genetics*, 137: 259–262, 2005.

BRITO, L. A. *et al*. Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. *American Journal of Medical Genetics: Part A*, 155: 1581–1587, 2011.

BURDICK, A. B. Genetic epidemiology and control of genetic expression in van der Woude syndrome. *J Craniofac Genet Dev Biol Suppl*, 2: 99-105, 1986.

BURDICK, A. B.; BIXLER, D.; PUCKETT, C. L. Genetic analysis in families with Van Der Woude syndrome. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, 5 (2): 181–208, 1985.

CHRISTOPHER, R. I. *et al*. Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (*IRF6*). *Nat Genet*, 38 (11): 1335–1340, 2006.

DESMYTER, L. *et al. IRF6* Screening of Syndromic and a priori Non-Syndromic Cleft Lip and Palate Patients: Identification of a New Type of Minor VWS Sign. *Mol Syndromol*, 1 (2): 67-74, 2010.

DURDA, K.M.; SCHUTTE, B.C.; MURRAY, J.C. *IRF6*-Related Disorders. 1993.

FRASER, F. C. Updating the genetics of cleft lip and palate. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 10 (8): 107-11, 1974.

GORLIN, R.J.; COHEN JR, M.M.; HENNEKAM, R.C.M. **Syndromes of the Head and Neck**, 4th edition, 1283, Oxford University Press, New York, 2001.

GROSEN, D. 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*, 47: 162-168, 2010.

HARPER, P. S. **Oral and craniofacial disorders. In: Practical Genetic Couselling**. 6th edition. London: Arnold Press. P 231. 2004.

IMAN S. et al. Mutation screening of *IRF6* among families with non-syndromic oral clefts and identification of two novel variants: Review of the literature. *European Journal of Medical Genetics*, 55: 389-393, 2012.

JEHEE, F. S. *et al*. Novel mutations in *IRF6* in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: when should *IRF6* mutational screening be done? *Am J Med Genet A,* 149A (6): 1319-22, 2009.

JIANG, R.; BUSH, J. O.; LIDRAL, A. C. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn*, 235 (5): 1152-66, 2006.

JONES, J. L. Wound complications after cleft repair in children with Van der Woude syndrome. *J Craniofac Surg*, 21 (5): 1350-3, 2010.

JUGESSUR, A.; MURRAY, J.C. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Current Opinion in Genetics & Development,* 15: 270–278, 2005.

KERRIGAN, J.J. *et al*. Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. *J R Coll Surg Edinb,* 45 (6): 351-8, 2000.

KNIGHT, A. S. et al. Developmental expression analysis of the mouse and chick orthologues of *IRF6*: The gene mutated in Van der Woude syndrome. *Dev. Dyn*, 235: 1441–1447, 2006.

KOILLINEN, H. *et al*. Mapping of the second locus for the Van der Woude syndrome to chromosome 1p34. *Eur J Hum Genet,* 9: 747–752, 2001.

KONDO, S. et al. Mutations In *IRF6* cause Van Der Woude And Popliteal Pterygium Syndromes. *Nature Genetics*, 32: 285-289, 2002.

KOT, M.; KRUK-JEROMINI, J. Analysis of family incidence of cleft lip and/or palate. *Med Sci Monit,* 13 (5): CR231-4, 2007.

LIMA, R. L. *et al*. Prevalence and nonrandom distribution of exonic mutations in interferon regulatory factor 6 in 307 families with Van der Woude syndrome and 37 families with popliteal pterygium syndrome. *Genetics IN Medicine,* 11 (4), 2009.

LITTLE, H. J. et al. *Missense* mutations that cause Van der Woude syndrome and popliteal pterygium syndrome affect the DNA-binding and transcriptional activation functions of *IRF6*. *Hum Mol Genet*, 18 (3): 535-45, 2009.

MANGOLD, E.; LUDWIG, K.U.; NOTHEN, M. M. Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. *Trends in Molecular Medicine,* 17 (12), 2011.

MATSUZAWA N. et al. Two *missense* mutations in the *IRF6* gene in two Japanese families with Van der Woude syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 98: 414–417, 2004.

MCENTYRE, J. ; OSTELL, J. **The NCBI Handbook** [Internet]. Chapter 18 ; The Reference Sequence (refseq) databasebethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002-. Disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/table/ch18.T.refseq_accession_numbers_and_mole/?Report=objectonly

MOSSEY, P.A. et al. Cleft lip and palate. *Lancet*, 374 (9703): 1773-85, 2009.

MURRAY, J.C. *et al.* Clinical and epidemiologic studies of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J*, 34: 7-10, 1997.

MURRAY, J.C. *et al.* Linkage of an autosomal dominant clefting syndrome (Van der Woude) to loci on chromosome 1q. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 486–491, 1990.

NEILSON, D.E. *et al.* Mixed clefting type in Rapp-Hodgkin syndrome. *Am J Med Genet*, 108 (4): 281-4, 2002.

PEGELOW, M. et al. Familial non-syndromic cleft lip and palate-analysis of the *IRF6* gene and clinical phenotypes. *European Journal of Orthodontics*. 30: 169–175, 2008.

PEYRARD-JANVID, M. et al. Dominant Mutations in GRHL3 Cause Van der Woude Syndrome and Disrupt Oral Periderm Development. *The American Journal of Human Genetics*, 94: 23–32, 2014.

RAHIMOV, F. Disruption of an AP-2a binding site in an *IRF6* enhancer is associated with cleft lip. *Nature Genetics*, 40: 1341-1347, 2008.

RINTALA, A. E., & RANTA, R. (1981). Lower lip sinuses. I. Epidemiology, microforms and transverse sulci. Br. J. Plastic Surg. 34: 26-30, 1981.

RIZOS M, SPYROPOULOS, MN. van der Woude syndrome: a review. Cardinal signs, epidemiology, associated features, differential diagnosis, expressivity, genetic counselling and treatment. Eur J Orthod., 26: 17-24. 2004.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, 365-386, 2000.

RUTLEDGE, K.D. et al. *IRF6* mutations in mixed isolated familial clefting. *Am J Med Genet A*, 152A (12): 3107-9, 2010.

SCAPOLI, L. Expression and association data strongly support JARID2 involvement in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat*, 31 (7): 794-800, 2010.

SCHUTTE, B.C. *et al.* A preliminary gene map for the Van der Woude syndrome critical region derived from 900 kb of genomic sequence at 1q32-q41. *Genome Res*, 10: 81–94, 2000.

SCHUTTE, B.C. *et al*. Refinement of the Van der Woude gene location and construction of a 3.5-Mb YAC contig and STS map spanning the critical region in 1q32-q41. *Genomics*, 36 (3): 507-14, 1996.

STANIER, P.; MOORE, G.E. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet*, 13 (1): R73-81, 2004.

VAN DER WOUDE ; A. Fistula labii inferioris congenita and its association with cleft lip and palate. *Am. J. Hum. Genet*, 6:244–256, 1954.

WASHBOURNE, B. J.; COX, T. C. Expression profiles of c*IRF6*, cLHX6 and cLHX7 in the facial primordia suggest specific roles during primary palatogenesis. *BMC Dev Biol*, 24: 6-18, 2006.

WU-CHOU *et al.* A combined targeted mutation analysis of *IRF6* gene would be useful in the first screening of oral facial clefts. *BMC Medical Genetics*, 14: 37, 2013
XIAOFANG W. et al. Novel mutations in the *IRF6* gene for Van der Woude syndrome. *Hum Genet*, 113: 382–386, 2003.

YUNA C. et al. Association of Common Variants, Not Rare Mutations, in *IRF6* With Nonsyndromic Clefts in a Honduran Population. *The Laryngoscope*, 2011.

ZUCCHERO, T. et al. Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *The New England Journal of Medicine*, 351: 769-780, 2004.

Anexo I:

FICHA DE DADOS CLÍNICOS PARA SOLICITAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Data: / / Local:
Registro:
Responsável pelo atendimento:

Nome do paciente:
Data de Nascimento: / /
Endereço:
Telefone:
Nome do responsável:

Tipo de fissura:

Lábio:

- Unilateral esquerda
- Unilateral direita
- Bilateral

Palato:

- Palato duro:
  - Pré-forame incisivo (gengiva)
  - Pós-forame
- Palato mole
- Palato duro+mole
- Submucosa
- Agenesia de úvula
- Úvula bífida

Andou: ( ) antes dos 18 meses ( ) depois dos 18 meses
Deficiência intelectual ou dificuldade escolar: ( ) não ( ) sim
Distúrbios psiquiátricos/comportamentais: ( ) não ( ) sim
Voz anasalada: ( ) não ( ) sim
Cardiopatia (defeito do septo ventricular, tetralogia de Fallot, outras): ( ) não ( ) sim
Depressões em lábio inferior ("pits"): ( ) não ( ) sim
Outros achados clínicos? ( ) não ( ) sim
Especificar:_____

Pais são consangüíneos? ( ) não ( ) sim Grau de parentesco:_____
Número de irmãos do propósito:____
Ordem do nascimento do propósito (circular): 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, ...
Há outros afetados na família? ( ) não ( ) sim
Grau de parentesco:_____Achadoclínico:_____

Amostra coletada:
Esfregaço de mucosa oral: ( ) não ( ) sim
Bochecho com sacarose: ( ) não ( ) sim
Sangue periférico: ( ) não ( ) sim

Anexo II

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Biobanco do Centro de Estudos do Genoma Humano
Instituto de Biociências

A pesquisa com material biológico humano é muito importante para conhecer as causas das doenças genéticas e também para desenvolver terapias que, no futuro, possam melhorar o tratamento dessas doenças e trazer benefícios para os pacientes e familiares.

Para esse fim, estamos pedindo a contribuição de uma amostra de ( ) sangue e/ou ( ) outro tecido (*especifique tipo*: _____) para a realização de pesquisas. A decisão de doar é voluntária, e você pode se recusar a doar. Isso em nada vai afetar o seu tratamento médico ou atendimento.

O Biobanco

As amostras doadas e materiais delas extraídos ficarão armazenadas no Biobanco do Centro de Estudos do Genoma Humano - Instituto de Biociências (CEGH-IB), sob a guarda do Comitê Gestor do Biobanco. Esse Biobanco também vai armazenar suas informações pessoais necessárias para a realização das pesquisas. As informações e os seus dados genéticos terão um código para preservar seu anonimato.

Utilização das Amostras em Pesquisas

As amostras do Biobanco somente poderão ser utilizadas em pesquisas que tenham como objetivo compreender os mecanismos das doenças genéticas humanas ou desenvolver terapias que tragam benefícios a portadores de doenças genéticas. Toda pesquisa realizada com as amostras do Biobanco deverá ser previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Biociências (CEP-IB).

As amostras doadas poderão ser cedidas a pesquisadores de outros centros, desde que os projetos de pesquisa tenham sido aprovados pelo CEP da instituição da qual se originou o pedido, pelo CEP-IBUSP e pelo Comitê Gestor do Biobanco. Nenhuma amostra será vendida ou comercializada.

Confidencialidade de Informação

Junto com a amostra doada, serão coletadas informações a seu respeito e sobre sua família, tais como idade, sexo, histórico de doenças genéticas, entre outras informações necessárias para a realização das pesquisas. Essas informações serão associadas a um

código para você não ser identificado. Toda informação a seu respeito e de sua família fornecida ao pesquisador será mantida em sigilo.

Desconfortos e Benefícios

( ) A doação da amostra de SANGUE não trará nenhum risco à sua saúde, além do desconforto da introdução da agulha para a retirada de sangue.

( ) A doação da amostra de MUCOSA ORAL não trará nenhum risco à sua saúde. A coleta é feita passando uma escovinha no interior da bochecha.

A doação da amostra de _____ (*especifique o tecido*)

( ) virá de material excedente de cirurgia já programada, que de outra forma seria descartado. Nenhum procedimento extra será necessário, e não haverá nenhum risco específico.

( ) virá de material descartado por processos biológicos naturais. Nenhum procedimento extra será necessário, e não haverá nenhum risco específico.

( ) necessitará de um procedimento específico para a coleta, como descrito abaixo:

(*Descreva o procedimento e os possíveis riscos ou desconfortos associados a ele*)

_____
_____
_____
_____
_____

Você não obterá benefício ao doar sua amostra para o banco. Nós esperamos que as pesquisas realizadas aumentem nosso conhecimento sobre as doenças humanas, e que isso um dia traga melhoria no diagnóstico e tratamento dessas doenças.

Retirada do Consentimento

É seu direito retirar o consentimento para utilização das suas amostras no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. Nesse caso, o material restante no banco será destruído, e não será usado em outras pesquisas. A retirada do consentimento não irá interferir no seu atendimento médico.

Resultado das Pesquisas

Os resultados das pesquisas serão publicados em revistas científicas e divulgados em encontros científicos. Nenhuma informação pessoal sua será divulgada.

Pesquisador responsável: _____

Contato: _____

Centro de Estudos do Genoma Humano
Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Biobanco do Centro de Estudos do Genoma Humano
Instituto de Biociências

Eu, (*insira nome e profissão*) _____, nascido(a) em ___ / ___ / ___, residente e domiciliado na _____ _____, portador da Cédula de identidade _____, abaixo assinado(a),

Responsável pelo menor _____, nascido em ___ / ___ / ___,

Declaro:

que fui informado pelo responsável abaixo assinado:

- do objetivo da doação;
- do local onde as amostras serão guardadas e condições de sua utilização em pesquisa;
- do procedimento para coleta bem como seus riscos e benefícios;
- da confidencialidade dos meus dados pessoais;
- que posso retirar meu consentimento para utilização das amostras a qualquer momento, sem prejuízo para o meu tratamento;
- entendi as informações e pude fazer todas as perguntas que julguei necessárias.

Concordo:

- de livre e espontânea vontade em doar amostras de _____ para o Biobanco do CEGH-IB;
- que minhas amostras e informações pessoais fiquem armazenadas nesse banco e venham a ser utilizadas em pesquisas futuras que tenham sido aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Biociências.

( ) Paciente / ( ) Responsável:

_____

Pesquisador responsável pela coleta:

_____

Material Suplementar:

PROBANDOS QUE TIVERAM TODOS OS EXONS DO *IRF6* SEQUENCIADOS. (As células vazias indicam que não foram encontradas variantes no exon)										
IDENTIFICAÇÃO DOS INDIVÍDUOS	**EXON 1**	**EXON2**	**EXON 3**	**EXON 4**	**EXON 5**	**EXON 6**	**EXON 7**	**EXON 8**	**EXON 9**	**EXON 9B**
F2639-1		HET rs2235377; HET rs861019			HET rs2013162	HET rs2235375	HET rs2235371; HET rs2235373			
F2640-1	HET rs34743335; HET rs12403006	HET rs861019		HET rs7552506	HET rs2013162	HET rs2235375				
F2654-1	HET c.-304-109C>T	HOM rs861019								
F2668-1					HOM rs2013162	HOM rs2235375	HOM rs2235371; HOM rs2235373			c.*293G>A
F2669-1	HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006			HET rs7552506	HET rs2013162	HET rs2235375				
F2781-1	HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006			HET rs7552506	HET rs2013162	HET rs2235375				
F2792-1	HET rs7545542;	HET rs861019								
F2796-1		HOM rs861019								
F2802-1	HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HETrs12403006	HET rs2235377		HET rs7552506	HOM rs2013162	HOM rs2235375	HET rs2235371; HET rs2235373			
F2803-1	HET rs7545538; HET rs34743335;	HET rs861019		HET rs7552506	HET rs2013162	HET rs2235375				
F2810-1		HET rs861019						HET rs138771192; HET rs145873101		
F2811-1	HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006	HET rs861019		HET rs7552506	HET rs2013162	HET rs2235375				

F2823-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F2827-1		**HET rs861019**								
F2828-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F2848-1	**HOM rs7545542; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**		**HET rs116094279**		
F2851-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019**								
F2856-1	**HET rs7545542; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F2870-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538**	**HOM rs2235377**			**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HOM rs2235371; HOM rs2235373**			
F2886-1		**HET rs861019**								
F2895-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs2235377**		**HET rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F2920-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538**	**HET rs2235377**		**HET rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235371; HOM rs2235373**			**HET rs17317411**
F2925-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F2929-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**		**HET rs116094279**		

F2930-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F2931-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			**HET rs17317411**
F2937-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs2235377**		**HET rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F2943-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538**	**HOM rs2235377**			**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HOM rs2235371; HOM rs2235373**			
F2944-1		**HET rs861019**						**HET rs116094279**		
F2951-1	**HET rs7545542; HOM rs7545538**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			
F3193-1		**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F3196-1	**HET rs34743335; HET rs12403006**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235373**			**HET rs17317411**
F3210-1	**HET rs7545538**	**HET rs861019**								
F3405-1	**HET rs7545538**	**HET rs2235377**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F3415-1		**HET rs861019**				**HET rs2235375**				
F3422-1		**HET rs861019**								
F3451-1		**HET rs861019**								
F3459-1		**HET rs861019**							**HET rs77906982**	**HET rs77906982**
F3459-2		**HET rs861019**							**HET rs77906982**	**HET rs77906982**
F3460-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377; HET rs861019**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			**c.*293G>A**
F3603-1								**HET rs116094279**		**HET rs75012801**
F3611-1		**HOM rs861019**							**HET rs77906982**	**HET rs77906982**
F3627-1		**HOM rs861019**								

F3637-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**			**HET rs77906982**	**HET rs77906982**
F3667-1		**HET rs861019**								
F3671-1	**HET rs7545538**	**HOM rs861019**								
F3685-1	**HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F3723-1		**HET rs861019**								
F3752-1		**HET rs861019**			**HET rs41304121**					
F3765-1		**HET rs861019**								
F3788-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235373**			**HET rs17317411**
F3810-1		**HET rs861019**								
F3877-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335;;**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				**HET rs75012801**
F3906-1	**HOM rs34743335; HOM rs12403006**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**				
F3946-1	**HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F3961-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377; HET rs861019**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F3963-1	**HOM rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377**		**HET rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F3968-1		**HET rs2235377; HET rs861019**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F4088-1		**HOM rs861019**								
F4090-1		**HET rs861019**								

F4093-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs2235377**		**HET rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235371; HOM rs2235373**			
F4094-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs2235377**		**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235373**			
F4101-1	**HET rs7545538**	**HET rs2235377; HET rs861019**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**		**HET rs77906982**	**HET rs77906982**
F4102-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F4107-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HOM rs34743335; HOM rs12403006**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**				
F4135-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HET rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F4138-1		**HET rs861019**								
F4523-1	**HET rs7545542; HET c.-304-106A>C; HET rs7545538**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**		**HET rs77906982**	**HET rs77906982; HET rs17317411**
F4523-2	**HET rs7545542; HET rs7545538**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs116578701; HET rs2235373**		**c.*199A>G**	**c.*199A>G**
F4580-1		**HET rs861019**								
F4827-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**	**HET rs61099902**		
F4861-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs34907424; HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			

F4889-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**			**HET rs7552506**	**HET rs34907424; HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			
F4984-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs861019**		**HOM rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F4984-2	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HOM rs34743335; HOM rs12403006**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**				
F5232-1		**HET rs861019**								
F5680-1		**HOM rs861019**								
F5848-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377; HET rs861019**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F5869-1		**rs145034080**								
F6210-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377; HET rs861019**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F6368-1	**HOM rs34743335; HOM rs12403006**	**HET rs861019**								
F6389-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HOM rs7552506**	**HET rs34907424; HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**				
F6389-2	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HOM rs34743335; HOM rs12403006**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**				
F6390-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs2235377**		**HET rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F6395-1										

F6445-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F6452-1		**HET rs861019**								**HET rs75012801**
F6457-1		**HOM rs861019**								
F6457-2	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**	**HET rs61099902**		
F6458-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**	**HET rs61099902**		**HET rs79863693**
F6464-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			**HET rs17317411**
F6466-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs34907424; HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			
F6468-1		**HET rs861019**								
F6471-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs2235377**		**HET rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F6473-1		**HOM rs861019**								
F6474-1		**HOM rs861019**								
F6474-2	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			**HET rs17317411**
F6476-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F6482-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**rs145034080**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F6483-1	**HET rs7545538**	**HOM rs861019**		**HET rs7552506**						

F6503-1	**HET rs7545538**	**HOM rs861019**		**HET rs7552506**						
F6505-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				**c.*382T>C**
F6525-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F6532-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**		**HET rs61099902**		
F6543-1		**HET rs861019**								
F6554-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HOM rs34743335; HOM rs12403006**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**				
F7180-1	**HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs861019**								
F7181-1		**rs145034080; HET rs861019**								
F7182-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**	**HET rs61099902**		
F7185-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HOM rs34743335; HOM rs12403006**				**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**		**HOM rs145873101**		
F7218-1		**HOM rs861019**								
F7262-1		**rs145034080; HOM rs861019**								
F7315-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs34907424; HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			

F7316-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235373**	**HET rs61099902**		
F7321-1	**HET c.-273G>C**	**HOM rs861019**								
F7346-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F7352-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**				**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F7398-1	**HOM rs7545538**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235373**			**HOM rs17317411**
F7399-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F7404-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006;**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F7412-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377; HET rs861019**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F7420-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HOM rs34743335; HOM rs12403006**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**				
F7431-1		**HOM rs861019**		**HOM rs7552506**						
F7452-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			**HET rs17317411**
F7457-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377; HET rs861019**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			

F7504-1		**HOM rs861019**								
F7516-1		**HOM rs861019**								**HET rs79863693**
F7606-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377; HET rs861019**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F7693-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			**HET rs17317411**
F7694-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377; HET rs861019**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F7697-1	**HET rs7545542; HET rs7545538.**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**		**HET rs77906982**	**HET rs77906982**
F7752-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019; HET rs147419621**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			
F7755-1		**HOM rs861019**								
F7756-1										
F7758-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs2235377; HET rs861019**				**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**			
F7782-1										
F7783-1		**HOM rs861019**								
F7784-1		**HOM rs861019**							**HET rs77906982**	**HET rs77906982**
F7785-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235373**			
F7786-1		**HET rs861019**								
F7787-1	**HET rs7545542; HET rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs861019**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F7788-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538**	**HET rs2235377**		**HET rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HOM rs2235373**			**HET rs17317411**
F7808-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**		**HET rs2235373**			**HET rs17317411**

F7939-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**HET rs2235377**			**HET rs2013162**	**HET rs2235375**	**HET rs2235371; HET rs2235373**	**HOM rs145873101**		

HET: "em heterozigose"; HOM: "em homozigose".

PROBANDOS COM EXONS 3,4 E 7 MAIS OUTROS EXONS SEQUENCIADOS (As células vazias indicam que não foram encontradas variantes no exon)										
IDENTIFICAÇÃO DOS INDIVÍDUOS	**EXON 1**	**EXON2**	**EXON 3**	**EXON 4**	**EXON 5**	**EXON 6**	**EXON 7**	**EXON 8**	**EXON 9**	**EXON 9B**
F2667-1	**Não sequenciado**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F2680-1	**c.-216G>A**	**Não sequenciado**				**Não sequenciado**		**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	
F2681-1		**HOM rs861019; HET rs147419621**			**Não sequenciado**	**Não sequenciado**				**Não sequenciado**
F2782-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**	**Não sequenciado**		**HOM rs7552506**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**HET rs2235373**	**Não sequenciado**		**Não sequenciado**
F2801-1	**Não sequenciado**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**Não sequenciado**	**HOM rs2235373**			**Não sequenciado**
F2849-1	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**		**HET rs7552506**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**		**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	
F2875-1	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**		**HET rs7552506**	**Não sequenciado**	**HOM rs2235375**	**HET rs2235371; HOM rs2235373**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**
F2889-1	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**			**Não sequenciado**			**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**
F2908-1	**Não sequenciado**	**HOM 133 rs2235377;**			**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**HOM rs2235371 HOM rs2235373**			
F2932-1		**HET rs861019**						**Não sequenciado**		**Não sequenciado**
F2983-1		**HET rs2235377; HET rs861019**			**HET rs2013162**	**Não sequenciado**	**HET rs2235371; HET rs2235373**	**Não sequenciado**		**Não sequenciado**
F3392-1		**Não sequenciado**						**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**
F3402-1	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**		**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**Não sequenciado**		**Não sequenciado**		**Não sequenciado**

F3626-1		**HOM rs861019**				**Não sequenciado**				**Não sequenciado**
F3630-1	**HOM rs7545542; HOM rs7545538**	**HET rs2235377**		**HET rs7552506**	**HOM rs2013162**	**Não sequenciado**	**HET rs2235371; HOM rs2235373**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**
F3656-1		**Não sequenciado**			**Não sequenciado**	**Não sequenciado**		**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**
F3679-1	**Não sequenciado**	**HOM rs861019**								
F3778-1	**Não sequenciado**	**HET rs861019**						**Não sequenciado**		
F3989-1		**HOM rs861019**						**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	
F4133-1	**Não sequenciado**			**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375**				
F5196-2	**Não sequenciado**			**HET rs7552506**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**		**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**
F5209-1		**HOM rs861019**	**c.-3-C>T**		**Não sequenciado**					
F7183-1	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**		**HOM rs7552506**	**Não sequenciado**	**HOM rs2235375**		**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**
F7221-1	**Não sequenciado**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**				**Não sequenciado**
F7391-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**	**Não sequenciado**		**HET rs7552506**	**HET rs2013162**	**HET rs2235375;**	**HET rs2235373**			**HET rs17317411**
F7483-1		**HET rs861019**				**Não sequenciado**			**Não sequenciado**	

HET: "em heterozigose"; HOM: "em homozigose".

INDIVÍDUOS COM EXONS DIVERSOS SEQUENCIADOS (As células vazias indicam que não foram encontradas variantes no exon)										
IDENTIFICAÇÃO DOS INDIVÍDUOS	**EXON 1**	**EXON2**	**EXON 3**	**EXON 4**	**EXON 5**	**EXON 6**	**EXON 7**	**EXON 8**	**EXON 9**	**EXON 9B**
F2634-1	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**HET rs2235373**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**
F2671-1	**HET rs7545542; HET rs7545538**			**Não sequenciado**	**HET rs2013162**		**HET rs2235373**			
F2675-1	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**		**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**
F2682-1	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**		**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**HOM rs2235371 HOM rs2235373**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**
F2753-1	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**		**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	**Não sequenciado**	

F2844-1	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	HOM rs2235375	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	
F2858-1	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado		Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F3468-1	Não sequenciado	Não sequenciado		Não sequenciado				Não sequenciado		Não sequenciado
F3610-1	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado		Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F3648-1	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado		Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F3936-1		Não sequenciado		HOM rs7552506	HET rs34907424; HOM rs2013162	HOM rs2235375	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	
F3982-1	Não sequenciado	Não sequenciado		HET rs7552506	Não sequenciado	HET rs2235375	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	
F4074-1	Não sequenciado	Não sequenciado		HET rs7552506	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F4116-1	Não sequenciado	Não sequenciado			Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F4126-1	HOM rs7545542; HET rs7545538	HOM rs2235377	Não sequenciado		HOM rs2013162	Não sequenciado	HOM rs2235371 HOM rs2235373	Não sequenciado		
F4884-1	Não sequenciado	Não sequenciado		HET rs7552506	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F5885-1	Não sequenciado	Não sequenciado			Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F5935-1	Não sequenciado	Não sequenciado			Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F6071-1	Não sequenciado	Não sequenciado		HET rs7552506	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F6604-2	Não sequenciado	Não sequenciado		HET rs7552506	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F6624-1	Não sequenciado	Não sequenciado		Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado		Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F6624-2	Não sequenciado	Não sequenciado		HET rs7552506	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F6630-1	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	HET rs2235371	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F7258-1	Não sequenciado	Não sequenciado		Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado		Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado
F7651-1		HOM rs861019					Não sequenciado			
F7655-1	Não sequenciado	HOM rs861019				Não sequenciado	Não sequenciado			Não sequenciado
F7948-1	Não sequenciado	HOM rs861019	Não sequenciado		Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado	Não sequenciado		Não sequenciado
F8250-1	HET rs7545542; HET rs7545538			HET rs7552506	HET rs2013162	HET rs2235375	Não sequenciado			HET rs17317411

F8250-2	**HOM rs7545542; HOM rs7545538; HET rs34743335; HET rs12403006**			**HOM rs7552506**	**HOM rs2013162**	**HOM rs2235375**	**Não sequenciado**			**HET rs17317411**
F5870-1			**rs2894293/ CM022374**	**HET rs7552506**	**HET rs34907424; HET rs2013162**					

HET: “em heterozigose”; HOM: “em homozigose”.

INDIVÍDUOS COM APENAS OS EXONS 3,4 E 7 SEQUENCIADOS			
IDENTIFICAÇÃO DOS INDIVÍDUOS	**EXON 3**	**EXON 4**	**EXON 7**
F1347-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F1773-4	**OK**	**OK**	**HET rs2235371; HET rs2235373**
F3236-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F4051-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F4055-1	**OK**	**OK**	**OK**
F4063-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F4066-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F4068-1	**OK**	**HOM rs7552506**	**HET rs2235373**
F4366-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F4375-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F4502-1	**OK**	**OK**	**OK**
F4515-1	**OK**	**HOM rs7552506**	**OK**
F4520-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F4524-1	**OK**	**OK**	**OK**
F4551-1	**OK**	**OK**	**OK**
F4561-1	**OK**	**OK**	**HET rs2235371; HET rs2235373**
F4584-1	**OK**	**OK**	**HET rs2235371; HET rs2235373**
F4592-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235371; HET rs2235373**
F4595-1	**OK**	**OK**	**OK**
F4597-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F4609-1	**OK**	**OK**	**OK**
F4614-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F4615-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F4847-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F4854-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F4868-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F4871-1	**OK**	**OK**	**OK**
F4893-1	**OK**	**OK**	**OK**
F4894-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F5077-1	**OK**	**OK**	**OK**
F5101-2	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F5147-1	**OK**	**HOM rs7552506**	**HET rs2235373**
F5184-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F5194-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235371; HET rs2235373**
F5196-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F5210-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F5222-1	**OK**	**OK**	**HOM rs2235371; HOM rs2235373**
F5296-1	**OK**	**OK**	**HET rs2235373**
F5314-1	**OK**	**OK**	**OK**
F5339-1	**OK**	**OK**	**HOM rs2235371; HOM rs2235373**
F5342-1	**OK**	**OK**	**HET rs2235371; HET rs2235373**
F5347-1	**OK**	**OK**	**HET rs2235371; HET rs2235373**
F5352-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235371; HET rs2235373**
F5357-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F5647-1	**OK**	**OK**	**OK**
F5750-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**

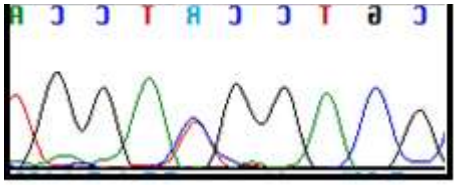
F5757-1	**OK**	**OK**	**OK**
F5765-1	**OK**	**HOM rs7552506**	**HET rs2235373**
F5776-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F5817-1	**OK**	**HOM rs7552506**	**HET rs2235373**
F5823-1	**OK**	**HOM rs7552506**	**OK**
F5827-1	**OK**	**OK**	**OK**
F5837-1	**OK**	**HOM rs7552506**	**HET rs2235373**
F5881-1	**OK**	**OK**	**OK**
F5882-1	**OK**	**OK**	**OK**
F5888-1	**OK**	**OK**	**HET rs2235371**
F5896-1	**OK**	**OK**	**OK**
F5901-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F5910-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F5974-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F6037-1	**OK**	**OK**	**HET rs2235371; HET rs2235373**
F6060-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F6068-1	**OK**	**OK**	**HET rs2235371; HET rs2235373**
F6077-1	**OK**	**OK**	**HET rs2235371**
F6188-1	**OK**	**OK**	**HOM rs2235373**
F6196-1	**OK**	**OK**	**HET rs2235371; HET rs2235373**
F6394-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F6426-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F6459-1	**OK**	**OK**	**OK**
F6462-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F6499-1	**OK**	**OK**	**OK**
F6558-1	**OK**	**OK**	**OK**
F6603-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235371; HOM rs2235373**
F6620-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F6624-3	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235371; HOM rs2235373**
F6625-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F6625-2	**OK**	**OK**	**HET rs2235371**
F6627-1	**OK**	**OK**	**OK**
F6628-1	**OK**	**OK**	**HET rs2235371**
F6631-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235371**
F6632-1	**OK**	**OK**	**OK**
F7381-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F7438-1	**OK**	**OK**	**OK**
F7444-1	**OK**	**OK**	**OK**
F7444-2	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F7463-1	**OK**	**OK**	**OK**
F7496-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F7498-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F7648-1	**OK**	**OK**	**OK**
F7649-1	**OK**	**OK**	**OK**
F7650-1	**OK**	**OK**	**OK**
F7656-1	**OK**	**OK**	**OK**
F7738-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F7739-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**
F7759-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F7789-1	**OK**	**OK**	**OK**
F7803-1	**OK**	**HOM rs7552506**	**OK**
F7810-1	**OK**	**HET rs7552506; HET rs146068713**	**c.781G>A**
F7910-1	**OK**	**OK**	**OK**
F7928-1	**OK**	**HET rs7552506**	**HET rs2235373**

F7933-1	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**
F7933-2	**OK**	**HET rs7552506**	**OK**

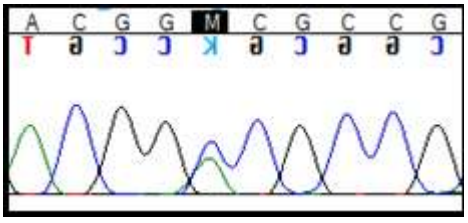
HET: “em heterozigose”; HOM: “em homozigose”.

Material Suplementar:

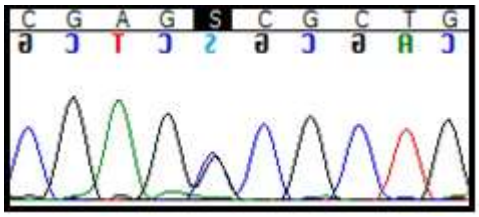
Representação dos eletroferogramas da mutação patogênica e das variantes novas encontradas na população estudada:



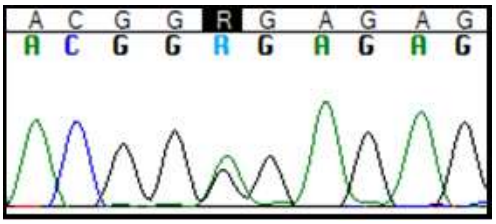
c.-304-109C>T (Paciente: 4523-1)



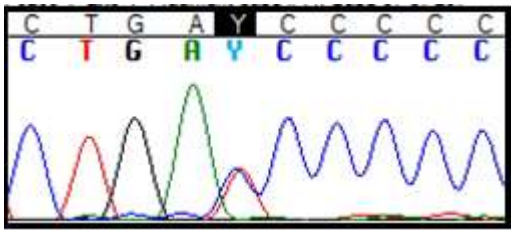
c.-304-106A>C (Paciente: F2654-1)



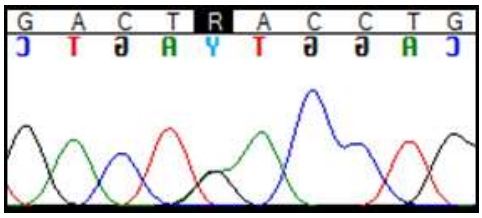
c.-273G>C (Paciente: F7321-1)



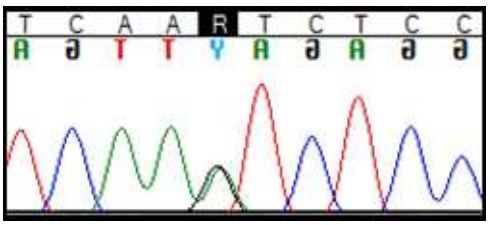
c.-216G>A (Paciente: F2680-1)



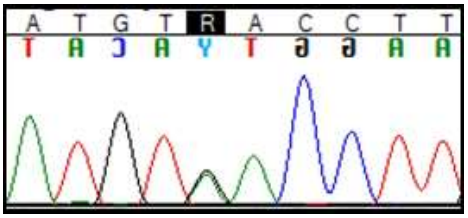
c.-3-9C>T (Paciente: F5209-1)



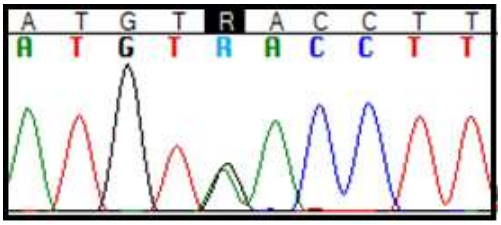
c.781G>A (Paciente: F7180-1)



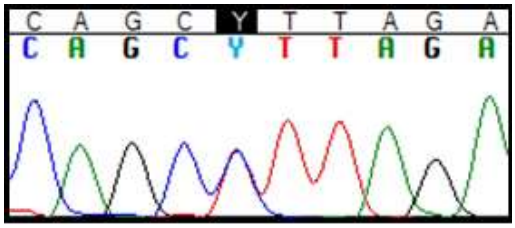
c.*199A>G (Paciente: F4523-2)



c.293G>A (Paciente: F2668-1)



c.293G>A (Paciente: F3460-1)



c.382T>C (Paciente: F6505-1)

Capítulo 2. Análise da contribuição genética nas fissuras palatinas não sindrômicas em uma população brasileira.

"Evaluation of genetic contribution in nonsyndromic cleft palate in a Brazilian population"

Abstract:

The cleft palate (CP), congenital malformations involving the palate, can be classified as syndromic or nonsyndromic (NS). The prevalence of nonsyndromic cleft palate (NSCP) is high, and it has been estimated between 0.13-0.4:1000. For NSCP, It is suggested a model of multifactorial inheritance, with contribution of genetic and environmental factors. There is a worldwide effort from research groups to elucidate which are these factors, since the understanding of the etiological components associated with CP may contribute to the development of preventive strategies. Epidemiological studies can provide relevant information for determination of genetic studies guidelines as well as for studies aiming the identification of environmental factors predisposing the malformations. Given the lack of epidemiological data for CP in the literature, particularly in Brazil, this work aims to estimate data related to inbreeding, recurrence risk and heritability of NSCP from a sample of 331 cases from a Brazilian population. The frequency of consanguineous marriages was similar to the control population and recurrence risks for siblings of probands (~1.5%) was lower than estimated in the literature. An heritability of 95.81% was found, suggesting a high influence of genetic component in the etiology of CP for this population. These results suggest that larger investments for identification of genetic factors predisposing NSCP can provide valuable results.

Key words: cleft palate; nonsyndromic cleft; heritability.

Resumo:

As fissuras palatinas (FP), malformações congênitas que envolvem apenas o palato, podem ser classificadas em sindrômicas ou não sindrômicas. A prevalência de fissuras palatinas não

sindrômicas (FPNS) é alta e tem sido estimada entre 0,13-0,4:1000. Sugere-se, para as FPNS, um modelo de herança multifatorial, com contribuição de fatores genéticos e ambientais. Há um esforço mundial entre os grupos de pesquisa na tentativa de elucidar quais são estes fatores, pois a compreensão dos componentes etiológicos associados às FP poderá contribuir na elaboração de estratégias preventivas. Estudos epidemiológicos podem fornecer informações relevantes tanto para o delineamento de estudos genéticos ou para estudos que possibilitem a identificação de fatores ambientais predisponentes às malformações. Tendo em vista a escassez de dados epidemiológicos para FP na literatura, em particular no Brasil, este trabalho tem como objetivo estimar dados relacionados à consanguinidade, risco de recorrência e herdabilidade das FPNS a partir de uma amostra de 331 casos de FPNS da população brasileira. A frequência de casamentos consanguíneos foi semelhante à da população controle e os riscos de recorrência para irmãos dos probandos (~1.5%) foi menor que o estimado na literatura mundial. Foi estimada uma herdabilidade de 95,81%, o que sugere grande atuação de componentes genéticos na etiologia das FP nesta população. Estes resultados sugerem a validade de maiores investimentos na identificação dos fatores genéticos de predisposição às FPNS.

Palavras-chave: fissura palatina; fissura não-sindrômica; herdabilidade.

1. Introdução:

As fissuras palatinas (FP) são malformações congênitas com uma ampla variabilidade clínica, podendo apresentar fenótipos leves, como a úvula bífida, até manifestações mais graves envolvendo todo o palato.

As FP podem ser classificadas em duas categorias: FP não sindrômicas (FPNS), quando ocorrem de forma isolada; FP sindrômicas (FP), quando estão associadas a outras malformações ou a alterações funcionais, como a deficiência intelectual. Vários estudos epidemiológicos estimaram que as FP não sindrômicos representam 50% dos casos totais (JUGESSUR & MURRAY, 2005; STANIER & MOORE, 2004; THOMASON & DIXON, 2009; GENISCA *et al*., 2009). Entre as formas mais frequentes de FP, estão a Síndrome de van der Woude (SVW) (com herança autossômica dominante e causada na sua grande maioria por mutações em heterozigose em *IRF6*) (KONDO *et al*., 2002), a Síndrome Velocardiofacial (SVCF) (com herança autossômica dominante e a maioria dos casos causada por microdeleções na região cromossômica 22q11.2) (SPRINTZEN *et al.*, 1978; GOTHELF *et al.*, 2009; FRIEDMAN *et al.*, 2011) e a Síndrome de Stickler (SS) (com herança autossômica dominante

e causada por mutações nos genes *COL2A1* (SS tipo I), *COL11A1* (SS tipo II), *COL11A2* (SS tipo III) (revisão em STEVENSON & HALL, 2006; BAKER *et al.*, 2011).

Considerando apenas as FPNS, a prevalência entre europeus foi estimada em 0,4:1000 (MANGOLD *et al.*, 2011; BEATY *et al.* 2011). Na América Latina, a prevalência das FPNS foi estimada em 0,13-0,17:1000 e foi considerada homogênea entre oito países, incluindo o Brasil, pesquisados no período de 1967-1981 (MENEGOTO & SALZANO, 1991; POLETTA *et al.*, 2007).

Baseando-se em evidências embriológicas, genéticas e epidemiológicas, tem-se sugerido que as FP representem uma entidade etiologicamente distinta das fissuras labiais com ou sem fissura palatina (FL±P) (MARAZITA, 2012; MOSSEY & LITTLE, 2002; STANIER & MOORE, 2004; FOGH-ANDERSEN, 1942; FRASER, 1955). O período de formação do palato é posterior ao de formação do lábio e maxila, de forma que esta é mais uma evidência de que FP têm origem embrionária distinta de FL±P (THOMASON & DIXON, 2009). A prevalência de FP é geralmente menor que de FL±P (MOSSEY *et al.*, 2009) e em geral os dois tipos de fissura não segregam em uma mesma família, o que reforça diferentes origens de desenvolvimento para cada forma de fissura (JUGESSUR & MURRAY, 2005). Entretanto, ocasionalmente, FP e FL±P podem segregar na mesma família, sugerindo, nestes casos, alguma sobreposição na etiologia destas duas categorias de fissuras. Famílias com ambos os tipos de fissuras são mais comumente observadas nas formas sindrômicas, como na SVW, e nas FL±P com hipodontia causada por mutações no gene *MSX1* (*muscle segment homeobox 1 gene*) (VAN DEN BOOGAARD *et al.*, 2000).

Há várias evidencias, como exemplificadas a seguir, que tem demonstrado uma forte base genética para FPNS. Há um maior risco de recorrência a depender do grau de parentesco dos indivíduos afetados: em comparação com a população geral, os riscos de recorrência em parentes de I, II e III graus de probandos com FPNS estão aumentados em 76x, 12x e 4x respectivamente (WOOLF *et al.*, 1963; SHIELDS *et al.*, 1981; BONAITI *et al.*, 1982; Revisado em CHRISTENSEN & MITCHELL, 1996; SIVERTSEN *et al.*, 2008). Em estudos envolvendo gêmeos, observou-se uma maior concordância para FPNS em monozigóticos que em gêmeos dizigóticos (GORLIN *et al.*, 2001; NORDSTRON *et al.*, 1996; GROSEN *et al.*, 2011), o que sugere uma herdabilidade alta para a ocorrência desta malformação (CHRISTENSEN & FOGH-ANDERSEN, 1993). Enquanto a herdabilidade para as FL±PNS têm variado entre 53% e 84% em diversas populações (LIN *et al.*, 1999; STOLL *et al.*, 1991;

CALZOLARI *et al.*, 1988; MENEGOTTO & SALZANO, 1991a; BRITO *et al.*, 2011), existem poucos estudos que estimam a herdabilidade para as FPNS.

O melhor modelo para explicar a agregação familiar de FPNS e que se adapta a maioria dos achados epidemiológicos é o de herança multifatorial, com efeitos aditivos de fatores genéticos frequentes e ambientais desencadeantes da malformação (CHRISTENSEN & MITCHELL, 1996; FRASER, 1974; SCHUTTE E MURRAY, 1999; GORLIN *et al.*, 2001, GROSEN *et al.*, 2010, MARAZITA, 2012). Uma hipótese alternativa seria que as FP sejam muito heterogêneas e mutações raras em vários genes poderiam então contribuir para a sua etiologia, pelo menos em uma proporção dos casos.

Espera-se que a compreensão dos componentes etiológicos associados às FP possa contribuir na elaboração de estratégias preventivas de novos casos, porém, raros são os estudos direcionados exclusivamente para as FPNS, provavelmente devido à sua menor prevalência e maior dificuldade de avaliação clínica (MOSSEY *et al.*, 2009).

A avaliação da herdabilidade, consanguinidade e risco de recorrência das malformações fornece informações relevantes tanto para o delineamento de estudos genéticos, quanto para a identificação de fatores ambientais predisponentes às malformações. Tendo em vista a escassez de dados epidemiológicos para FP na literatura (MANGOLD *et al.*, 2011), em particular no Brasil, objetivamos estimar esses dados para esta malformação na população brasileira.

2. Métodos:

2.1. Tipo de estudo:

Trata-se de um estudo transversal descritivo.

2.2. População:

A população estudada foi constituída de famílias nas quais o propósito tinha FPNS. Essas famílias foram atendidas pelo programa médico comunitário da organização não governamental *Operação Sorriso* (http://www.operationsmile.org/), com a colaboração dos hospitais locais, entre 2007 e 2012, em cinco cidades de três diferentes regiões do país: Santarém-PA (Região Norte), Fortaleza-CE, Barbalha-CE e Maceió-AL (Região Nordeste) e Rio de Janeiro-RJ (Região Sudeste).

2.2.1. Critérios de classificação:

Um caso foi classificado como familial, se houvesse relato de um outro parente em I, II ou III grau, também afetado. As proporções de casos familiais e frequências de parentes em I grau (pais ou irmãos) afetados do propósito foram estimadas para cada região. Devido a restrições em relação às informações fornecidas pelos pacientes, conseguimos informações detalhadas sobre o fenótipo dos parentes afetados em apenas 31 dos 82 casos familiais, o que impossibilitou uma melhor caracterização em relação aos tipos de fissuras que segregavam nas famílias.

Não foi identificado nenhum par de gêmeos afetados.

2.3. Instrumentos:

Durante o atendimento das famílias, foi aplicado um questionário (Anexo 1) para obtenção de informações sobre a consanguinidade e existência de outros parentes afetados, informações estas necessárias para a estimativa da herdabilidade. Também foram obtidas informações como idade e sexo do indivíduo, classificação anatômica da fissura, grau de parentesco dos familiares afetados e informações sobre antecedentes gestacionais. Foram excluídas deste estudo as famílias nas quais se verificou que o propósito apresentava outra anomalia além da fissura, caracterizando uma possível forma sindrômica. Indivíduos com qualquer tipo de malformação cardíaca e/ou deficiência mental foram também excluídos do estudo, devido à maior probabilidade de tratar-se de uma forma sindrômica como, por exemplo, a SVCF (GOLDBERG *et al.*, 1993).

2.4. Análise estatística:

Foram calculadas estatísticas descritivas utilizando o software *Microsoft Excel*®, como a razão entre os sexos, a proporção de casos familiais e de parentes em I grau afetados, a frequência de consanguinidade, o risco de recorrência e a herdabilidade para FPNS. Não foram realizadas estatísticas inferenciais, uma vez não ser possível a estimativa do erro padrão, já que foi estudada toda a população-alvo (LUDWIG, 2005; PEREIRA, 2010).

2.4.1. Cálculo de herdabilidade:

Os valores da herdabilidade (h^2) para FPNS foram estimados, para a amostra total, a partir da correlação entre a incidência da malformação entre os parentes em I grau dos

probandos e na população geral. Utilizamos o método I de Falconer (FALCONER, 1965) que faz uso das seguintes fórmulas (1) e (2):

$$b = \frac{x_p - x_r}{\alpha_p} \quad (1)$$

Onde:

b: correlação fenotípica;

x_p: desvio padrão entre o limiar de susceptibilidade para o fenótipo e a susceptibilidade média da população geral;

x_r: desvio padrão entre o limiar de susceptibilidade dos parentes em I grau dos probandos e a susceptibilidade média entre parentes;

α_p: desvio padrão entre o limiar de susceptibilidade média dos probandos e a susceptibilidade média da população geral.

$$h^2 = \frac{b}{r} \quad (2)$$

Onde:

h^2: herdabilidade;

r: coeficiente de parentesco ou consangüinidade.

2.4.2. Cálculo do Coeficiente de endocruzamento:

Para parentes em I grau, o valor de r ou coeficiente de parentesco é considerado ½ (proporção de genes compartilhados por parentes em I grau) baseado no método da Análise de Trilha desenvolvido por Wright (*Wright's method of path coefficients*) (WRIGHT, 1922, 1923).

Na genética clínica um casamento consangüíneo é definido como uma união entre dois indivíduos que são primos em II grau ou que têm um parentesco mais próximo, apresentando um coeficiente de endocruzamento (*F*) igual ou maior que 0,0156 (BITTLES, 2001). Nos casos em que o probando era um produto de um casamento consanguíneo, a família foi classificada como consanguínea e o *F* correspondente foi calculado. Para obter a estimativa do *F médio* da amostra total, calculamos o somatório dos produtos dos *F* dos diferentes graus de

consanguinidade entre os genitores dos probandos pelas frequências com que ocorrem na população, incluindo a classe de *F*=0 (casamentos não consanguíneos) (WRIGHT, 1922, 1934).

2.4.3. Cálculo dos Riscos de recorrência:

Os riscos de recorrência para os irmãos dos probandos foram calculados, através da fórmula (3) (adaptada de EMERY, 1986):

$$\text{Risco de recorrência} = \frac{NFA - NF}{NFA + NFN - NF} \qquad (3)$$

Onde:

NFA: número de filhos afetados;

NFN: número de filhos não afetados;

NF: número de famílias.

Logo, o numerador **(NFA-NF)** corresponde ao número total de irmãos afetados excluindo os probandos que correspondem ao número de famílias. O denominador **(NFA + NFN - NF)** equivale ao número total de irmãos afetados (NFA) somado ao número de irmão não-afetados (NFN) subtraindo-se o número de famílias (que é igual ao número de probandos), ou seja, o risco de recorrência relativo para FP é o risco de FP nos indivíduos com um parente de primeiro grau afetado, dividido pelo risco de FP nos indivíduos sem parentes afetados. Finalmente, a fórmula 3 corresponde ao número de irmãos afetados sobre o número total de irmãos, excluindo os probandos. A diferença entre o risco de recorrência para crianças nascidas de mãe ou pais afetados não pôde ser estimado neste estudo devido ao pequeno tamanho amostral.

3. Resultados:

Foram avaliadas 331 famílias, nas quais o propósito apresentava FPNS, entrevistadas entre os anos de 2007 e 2012 durante as missões do Programa da *Operação Sorriso* em cinco cidades. Em relação às diferentes procedências, houve 28 famílias provenientes de Barbalha, 95 de Fortaleza, 63 de Maceió, 88 do Rio de Janeiro e 57 famílias provenientes de Santarém. Por pertencerem ao mesmo Estado e devido ao pequeno número de indivíduos provenientes de Barbalha, as populações de Barbalha e Fortaleza foram avaliadas em conjunto.

Em relação à razão entre os sexos, a proporção de mulheres com FPNS foi maior que a de homens em todas as regiões, sendo a razão média da amostra total igual a 1,31 mulheres:1 homem (Tabela I).

Quanto à classificação anatômica das fissuras, a maioria dos casos apresentava fissura de palato duro e mole (61%), enquanto 37% dos casos apresentava apenas acometimento de palato mole (incluindo apenas úvula bífida ou agenesia de úvula) e 2% apenas fissura submucosa.

Tabela I. Distribuição dos pacientes de acordo com o sexo e localidade.

Localidade	**Feminino (F) n(%)**	**Masculino (M) n(%)**	**(F-M)%**	**Razão entre sexos (F/M)**
Barbalha/Fortaleza	71(57,7%)	52 (42,3%)	15,4%	1,36
Maceió	34(53,9%)	29 (46,1%)	7,8%	1,17
Rio de Janeiro	54 (61,4%)	34 (38,6%)	22,8%	1,59
Santarém	29 (50,9%)	28 (49,1%)	1,8%	1,04
Total	188 (56,8%)	143 (43,2%)	13,6%	1,31

Para avaliar a contribuição genética nas FPNS na população estudada, primeiro foi estimada a frequência de casos familiais e o número de parentes (em I grau) afetados, como mostrado na Tabela II. A proporção de casos familiais na população como um todo foi de 25%, variando de 16% a 32% a depender da localidade. A proporção de parentes em I grau afetados apresentou um valor médio de 1,68%, variando de 1,04% a 2,61% (Tabela II).

Tabela II. Proporção de casos familiais e de parentes em I grau afetados por fissuras distribuídos por localidade.

Localidade	Proporção de casos familiais n (%)	Proporção de parentes em I grau afetados n (%)
Barbalha/ Fortaleza	30/123=24%	5/479=1,04%
Maceió	10/63=16%	4/253=1,58%
Rio de Janeiro	28/88=32%	10/383=2,61%
Santarém	14/57=25%	4/253=1,58%
Total	82/331=25%	23/1368=1,68%

A herdabilidade (h^2) de características quantitativas com efeito de limiar, como as fissuras não sindrômicas, pode ser estimada caso sejam conhecidas as incidências da característica na população geral e entre os parentes em I grau de uma amostra de afetados. Os valores adotados em nosso estudo foram: incidência média de FPNS na população geral= 0,015% (MENEGOTTO & SALZANO, 1991b; POLETTA *et al.*, 2007); incidência entre os parentes em I grau dos probandos em nosso estudo = 1,68%. Para estimar a h^2 em nossa população alvo, utilizamos as incidências, acima citadas para obter os valores de xp, xr e αp: xp = 2.1699, xr = 0.9599 e αp = 2.5258. Esses valores são originários de tabelas de distribuição normal para caracteres com herança multifatorial (disponíveis em: http://www.ihh.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetik/applets/heritt.htm). Utilizando o método I de Falconer (fórmula 1), encontramos o valor da correlação fenotípica entre os probandos e seus parentes em I grau (b)= 0,4790. O valor da h^2 estimado para a população alvo foi de 95,81%.

Avaliamos também o papel da consanguinidade na ocorrência de FPNS nesta população. As freqüências de consanguinidade entre os genitores dos probandos variaram de 4% a 13%, sendo maior na localidade de Barbalha/Fortaleza, com um valor médio de 8%, (Tabela III).

Os coeficientes de endocruzamento (F) variaram por localidade e o maior valor também foi observado na localidade de Barbalha/Fortaleza. O coeficiente médio de endocruzamento encontrado foi de 0,00307 (3:1000) (Tabela IV).

Tabela III. Frequências de casos consanguíneos nas populações afetadas e nas populações controle (FREIRE-MAIA, 1957) distribuídos por localidade.

Localidade	Consanguinidade no presente estudo (%)	Consanguinidade em populações controle (%)	Consanguinidade população estudada / população controle
Barbalha/ Fortaleza	16/123 = 13%	8,99%	1,45
Maceió	4/63 = 6%	2,32%	2,6
Rio de Janeiro	4/88 = 5%	2%	2,5
Santarém	2/57 = 4%	1,82%	2,2
Total	26/331=8%	-	-

Tabela IV. Coeficientes de endocruzamento (F) nas populações afetadas e nas populações controle (FREIRE-MAIA, 1957) distribuídos por localidade.

Localidade	*F* médio das populações estudadas	*F* médio das populações controle (Freire-Maia, 1957)	*F* médio da pop estudada/ população controle
Barbalha/ Fortaleza	0,00495	0,00433	1,14
Maceió	0,00322	0,00121	2,66
Rio de Janeiro	0,00124	0,00108	1,15
Santarém	0,00164	0,00156	1,05

O valor médio do risco de recorrência, baseado na existência de um membro afetado na irmandade, foi de 1,56%. Os valores variaram de 1,12% em Fortaleza a 2,16% em Santarém (Tabela V). Devido ao tamanho amostral, não foi possível considerar as localidades separadamente, sendo considerado apenas o valor para população como um todo.

Tabela V. Distribuição do número total de irmãos, número de irmãos afetados por fissuras e risco de recorrência por localidade.

Localidade	Total de irmãos (n)	Irmãos afetados (n)	Risco de recorrência (%)
Barbalha/ Fortaleza	233	2	0, 9%
Maceió	127	2	1,57%
Rio de Janeiro	207	4	1,93%

Santarém	139	3	2,16%
Total	706	11	1,56%

4. Discussão e Considerações finasi:

A maioria das pesquisas epidemiológicas sobre fissuras orofaciais tem como principal objeto de estudo as FL±P e poucos estudos focam-se apenas nas FP, apesar da prevalência significante desta malformação, tanto como única malformação ou associada a outras síndromes. A identificação de parâmetros populacionais que possam estar envolvidos com a ocorrência das FP é importante para o delineamento de estratégias adequadas de investigação da sua etiologia.

Na população estudada, constituída de 331 casos de FPNS, observamos uma razão sexual feminino/masculino (F/M) de afetados de 1,31:1. Esta estimativa, apesar de estar mais baixa do que a proporção de 1,78:1 F/M observada por Martelli *et al.* (2012), em uma população de 75 indivíduos brasileiros portadores de FPNS, é bastante comparável a outras populações de FPNS de ancestralidade européia: em um GWAS conduzido com 550 indivíduos com FPNS de um Consórcio Internacional, a proporção sexual encontrada foi de 1,27:1 F/M (BEATY *et al.*, 2011); a proporção encontrada na Dinamarca, em uma amostra de 1364 indivíduos, foi de 1,09:1 F/M afetados (CHRISTENSEN & MITCHELL, 1996); Bonaiti (1982) encontrou uma proporção de 1,58:1 F/M afetados em uma população de 168 indivíduos com FPNS na França. Logo, considerando-se diferentes grupos étnicos, as FPNS têm sido detectadas mais comumente em mulheres (MOSSEY *et al.*, 2009). Uma frequência mais elevada no sexo feminino, semelhante entre as várias populações, favorece a existência de um mecanismo embrionário ligado ao sexo, como o maior tempo para fechamento das lâminas palatinas na embriologia do sexo feminino (NISWANDER *et al.*, 1972). Sob a perspectiva do modelo de herança multifatorial, este seria o resultado de uma diferença entre as distribuições de susceptibilidades para FPNS para homens e mulheres (CARTER, 1961).

No presente estudo, a proporção de casos familiais para a população total foi estimada em 25%. Este resultado foi semelhante à estimativa de 23,5% obtida em um estudo anterior realizado por Martelli *et al.* (2010) a partir de uma pequena amostra de 34 pacientes com FPNS no Brasil e, não muito diferente de outro estudo realizado em uma população na França, no qual verificou-se uma freqüência de 17,18% de casos familiais entre 163 probandos com FPNS (BONAITI et al., 1982), apesar dos diferentes tamanhos populacionais avaliados.

A proporção de indivíduos com fissuras entre os parentes em I grau, no presente estudo, teve um valor médio de 1,68%, quase 4x menor que a proporção de 6,5% encontrada em uma população de 44 famílias caucasianas nos EUA (Beaty *et al.* 2001), e apenas 1,6x menor que a encontrada em uma população de 163 famílias (2,8%) na França (BONAITI *et al.*, 1982). É possível que estas diferenças estejam, pelo menos em parte relacionadas com o número de parentes em I grau dos probandos incluídos nestas estimativas: enquanto na nossa casuística tivemos uma proporção de parentes em I grau/ probando de 4,13, no estudo de Beaty *et al.* (2001) esta proporção foi de apenas 2,77. Já no estudo de Bonaiti *et al.* (1982), onde as diferenças quanto à proporção de parentes afetados em I grau foram mais comparáveis, esta proporção foi semelhante ao de nosso estudo (4,09).

Nas FPNS, devido à falta de completa compreensão sobre os seus mecanismos etiológicos, os riscos de recorrência têm sido empiricamente determinados através de estudos epidemiológicos. O risco de recorrência para a amostra total no presente estudo foi de 1,56%. Estes valores são ligeiramente inferiores aos de outros estudos populacionais, nos quais tem-se estimado um risco de recorrência de 3,1 % porém, nesta estimativa, foram incluídos casos sindrômicos, os quais podem ter herança mendeliana e consequentemente podem estar contribuindo para um risco de recorrência mais elevado (GROSEN *et al.*, 2010). O risco de recorrência de FPNS para parentes em I grau foi estimado, em uma população na Dinamarca, em 2,54% por Christensen e Mitchell (1996), em 2,94% por Fitzpatrick e Farrall (1993) (CHRISTENSEN & MITCHELL, 1996) e em 2,9% no estudo de Bonaiti *et al.* em uma população na França (1982). Estes riscos de recorrência, estimados a partir de estudos populacionais de recém-nascidos, apesar de variarem, foram sempre baixos, inferiores a 3%. Nestes estudos, nem sempre foi possível excluir os casos sindrômicos, os quais, particularmente aqueles associados com um padrão de herança dominante ou ligado ao X, podem estar contribuindo em parte para um maior risco de recorrência da FP. Em contraposição, Beaty *et al.* (2001) estimaram um risco de 8,8%, cerca de 5,6x maior que o do presente estudo, o que pode estar relacionado ao pequeno tamanho amostral utilizado nesta estimativa, conforme discutido acima.

O valor da herdabilidade para a população estudada foi estimado em 95,81%, valor esse, semelhante aos encontrados em estudos realizados na Dinamarca para FPNS: Christensen e Mitchell (1996), estimaram uma herdabilidade de 85% ao avaliar uma população de 1368 indivíduos; em estudos anteriores no mesmo país, Fitzpatrick e Farrall (1993) encontraram valores de herdabilidade de 90%. Nota-se que apesar do maior tamanho populacional dos

estudos dinamarqueses, os valores de herdabilidade encontrados são semelhantes ao do presente estudo.

Em regiões como a Europa, América do Norte e Austrália, menos de 1% dos casamentos são considerados consangüíneos (Bittles, 2001). Como na população brasileira, a taxa de consangüinidade (1-10%) é maior que nesses continentes, consideramos importante avaliar essa característica nas famílias com FPNS em nossa população, uma vez que a consanguinidade pode contribuir para a ocorrência de doenças de herança multifatorial (RUDAN *et al.*, 2003, 2006). A taxa de consanguinidade bem como o *F* de quatro das cinco populações com FPNS avaliadas neste estudo foram similares quando comparadas às populações controles brasileiras estudadas nas mesmas localidades (FREIRE-MAIA, 1957). Estes resultados, portanto, sugerem que o endocruzamento não está contribuindo de maneira significativa para a etiologia das FPNS na maioria das populações estudadas. Em Maceió, contudo, tanto a taxa de consanguinidade como o valor de F foram ligeiramente maiores (2,6x) do que as populações controle. Uma amostra maior deve ser avaliada para verificar a importância da consanguinidade na ocorrência das FP neste grupo populacional.

Traçando um paralelo entre o presente estudo e o estudo epidemiológico realizado para as FL±P das mesmas localidades por Brito *et al.* (2011), observa-se que em relação à razão entre os sexos, a proporção de mulheres com FPNS foi maior que a de homens em todas as regiões, enquanto para as FL±P, a proporção de homens é maior que a de mulheres com um valor médio de 1,6:1. Ambos os achados corroboram os dados da literatura mundial para as respectivas malformações.

Enquanto que para as FL±P, houve uma maior proporção de casos familiais na população de Santarém (44%) e Fortaleza/Barbalha (38,5%), em nosso estudo esta proporção nestas mesmas localidades foram similares à nossa média geral (25%). Estas variações podem ter ocorrido devido ao nosso menor tamanho amostral ou podem refletir diferenças entre os fatores etiológicos envolvidos nos dois tipos de fissuras. Diferentemente dos resultados obtidos para FL±P, não parece haver uma subpopulação de FP que deva ser priorizada para estudos genéticos.

A contribuição dos fatores genéticos para as FP encontrada neste estudo (95,81%) é maior que a herdabilidade encontrada para as FL±P nas mesmas populações brasileiras aqui averiguadas (valores variaram de 45% a 85% a depender da região estudada) (BRITO *et al.*,

2011). Esse dado parece corroborar os dados da literatura que mostram maior herdabilidade para FP que para FL±P.

Estes resultados têm implicações diretas para aconselhamento genético, uma vez que fornecem informações mais precisas sobre os riscos genéticos para as famílias brasileiras com FPNS. Considerando-se o alto valor de herdabilidade encontrado na população alvo para FPNS, pode-se sugerir que haja um importante componente genético para este tipo de fissura e reforça a importância de maiores investimentos na identificação dos fatores genéticos para as FPNS. A identificação de tais fatores pode, no futuro, contribuir para delimitação estratégias de pesquisa em saúde pública para reduzir a prevalência de novos casos de FPNS.

Referências Bibliográficas:

BAKER, S. *et al.* A loss of function mutation in the COL9A2 gene cause autosomal recessive Stickler syndrome. *Am. J. Med. Genet*. 155A: 1668-1672, 2011.

BEATY, T. H. *et al.* Evidence for gene-environment interaction in a genome wide study of isolated, non-syndromic cleft palate. *Genet Epidemiol*, 35(6): 469-478, 2011.

BITTLES, A. H. Consanguinity and its relevance to clinical genetics. *Clin Genet*, 60: 89–98, 2001.

BITTLES, A. H.; BLACK, M. L. Global Patterns & Tables of Consanguinity, 2013. Disponível em: http://consang.net

BONAITI, C. *et al.* An epidemiological and genetic study of facial clefting in France. I Epidemiology and frequency in relatives. *J Med Genet*, 19:8-15, 1982.

BRITO, L. A. *et al.* Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. *Am J Med Genet Part A*, 155:1581-1587, 2011.

CALZOLARI, E. *et al.* Epidemiological and genetic study of 200 cases of oral cleft in the Emilia Romagna region of northern Italy. *Teratology*, 38(6):559-64, 1988.

CARTER, C. O. The inheritance of congenital pyloric stenosis. *Br Med Bull*, 17:251-4, 1961.

CHRISTENSEN, K. & FOGH-ANDERSEN, P. Cleft lip (+/- cleft palate) in Danish twins, 1970-1990. *Am J Med Genet*, 47:910-6, 1993.

CHRISTENSEN, K. & MITCHELL, L. E. Familial recurrence-pattern analysis of nonsyndromic isolated cleft palate: a Danish Registry study. *Am J Hum Genet*, vol. 58, no. 1, pp. 182-90, 1996.

EMERY, A. E. H. **Methodology in medical genetics.** Edinburgh: Churchill Livingstone, 1986, p 198.

FALCONER, D. S. The inheritance of liability to certain diseases, the incidence among relatives. *Ann Hum Genet*, 29:51–76, 1965.

FITZPATRICK, D. & FARRALL, M. An estimation of the number of susceptibility loci for isolated cleft palate. *J Cranifac Genet Dev Biol*, 13:230-235, 1993.

FOGH-ANDERSEN, P. **Inheritance of Harelip and Cleft Palate**. Copenhagen: Munksgaard, 1942.

FRASER, F. C. Thoughts on the etiology of clefts of the palate and lip. *Acta Genet Stat Med*, 5:358-369, 1955.

FRASER, F. C. Updating the genetics of cleft lip and palate. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 10(8):107-11, 1974.

FREIRE-MAIA, N. Inbreeding in Brazil. *Am J Hum Genet*, 9(4):284-98, 1957.

FRIEDMAN, *et al.* Cleft Palate, Retrognathia and Congenital Heart Disease in Velo-Cardio-Facial Syndrome: A Phenotype Correlation Study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 75(9): 1167–1172, 2011.

GENISCA, A.E. *et al.* Orofacial clefts in the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2004. *Am J Med Genet A*, 149A(6):1149-58, 2009.

GOLDBERG, R. *et al.* Velo-cardio-facial syndrome: a review of 120 patients. *Am J Med Genet*, 1;45(3):313-9,1993.

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

GOTHELF, D. *et al.* Velo-Cardio-Facial syndrome. *J Ment Health Res Intellect Disabil*, 2(2): 149, 2009.

GROSEN, D. *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,* vol. 47, no. 3, pp. 162-8, 2010.

GROSEN, D. *et al.* Risk of oral clefts in twins. *Epidemiology,* vol. 22, no. 3, pp. 313-9, 2011.

JUGESSUR, A. & MURRAY, J. C. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15:270-278, 2005.

KOILLINEN, H. A genome-wide scan of non-syndromic cleft palate only (CPO) in Finnish multiplex families. *J. Med. Genet*. 42,177-184, 2005.

KONDO, S. *et al.* Mutations in *IRF6* cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet,* vol. 32, no. 2, pp. 285-9, 2002.

LIN, Y. C. *et al.* Cleft of the lip and palate in twins. *Changgeng Yi Xue Za Zhi*, 22(1):61-7, 1999.

LUDWIG, D. A. Use and misuse of p-values in designed and observational studies: guide for researchers and reviewers. Aviat Space Environ, Med, 2005, 76:675-80.

MANGOLD, E.; LUDWIG, K.U.; NOTHEN, M. M. Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. *Trends in Molecular Medicine,* vol. 17, no. 12, december, 2011.

MARAZITA, M. L. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. , 13:263-83, 2012.

MARTELLI, D. R. B. *et al.* Maternal and paternal age, birth order and interpregnancy interval evaluation for cleft lippalate. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 76(1):107-12, 2010.

MARTELLI, D. R. B. *et al.* Non sindromic cleft lip and palate: relationship between sex and clinical extension. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 78(5), 2012.

MENEGOTTO, B. G. & SALZANO, F. M. Clustering of malformations in the families of South American oral cleft neonates. *J Med Genet,* vol. 28, no. 2, pp. 110-3, 1991a.

MENEGOTTO, B. G. & SALZANO, F. M. Epidemiology of Oral Clefts in a large south American Sample. *Cleft Palate Craniofac J,* 28(4):373-6; discussion 376-7, 1991b.

MOSSEY, P. A. & LITTLE, J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: Wyszynski, D.F, (ed.) **Cleft lip and palate: from origins to treatment**. New York: Oxford University Press; 2002. p.127-58.

MOSSEY, P. A *et al.* Cleft lip and palate. *Lancet,* 21;374(9703):1773-85, 2009.

NISWANDER, J. D. *et al.* Sex ratio and cleft lip with or without cleft palate. *Lancet,* 21;2(7782):858-60, 1972.

NORDSTROM, R. E. *et al.* Cleft-twin sets in Finland 1948-1987. *Cleft Palate Craniofac J,* vol. 33, no. 4, pp. 340-7, 1996.

PEREIRA, C. The role of the statistical editor. Rev Bras Psiquiatr, 32(2):102–102, 2010.

POLETTA F. A. *et al.* Regional analysis on the occurrence of oral clefts in South America. *Am J Med Genet*, Part A, 143A:3216-3227, 2007.

RUDAN, I. *et al*. Inbreeding and the Genetic Complexity of Human Hypertension. *Genetics,* 163:1011-1021, 2003.

RUDAN, I. *et al*. Contribution of consanguinuity to polygenic and multifactorial diseases. *Nat Genet,* 38(11):1224-5, 2006.

SALZANO, F. M. & FREIRE-MAIA, N. **Populações Brasileiras**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1967, 178 pags.

SCHUTTE, B. C.; MURRAY, J. C. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet,* 8(10):1853-9, 1999.

SHIELDS, E.D.; BIXIER, D.; FOGH-ANDERSEN, P. Cleft palate: a genetic and epidemiologic investigation. *Clin Genet* , 20:13-24, 1981.

SIVERTSEN, A. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ,* vol. 336, no. 7641, pp. 432-4, 2008.

SHPRINTZEN, R.J. *et al.* A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: Velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J*, 8; 15(1):56-62, 1978.

STANIER, P. & MOORE, G. E. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet*, vol. 13 Spec no 1, no. R73-81, 2004.

STEVENSON, R. E.; HALL, J.G. **Human malformations and related anomalies**. 2nd edition. Oxford University Press, 2006. 1495 pags.

STOLL, C. *et al.* Epidemiological and genetic study in 207 cases of oral clefts in Alsace, north-eastern France. *J Med Genet*, 28(5):325-9, 1991.

THOMASON, H. A.; DIXON, M. J. Craniofacial Defects and Cleft Lip and Palate. In: **Encyclopedia of Life Sciences (ELS)**. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2009.

VAN DEN BOOGAARD, M. J. *et al.* MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet*, 24(4):342-3, 2000

WOOLF, C. M.; WOOLF, R. M.; BROADBENT, T. R. A genetic study of cleft lip and palate in Utah. *Am J Med Genet*, 15:209-215, 1963.

WRIGHT, S. Coefficients of inbreeding and relationship. *Amer. Natur*, 56:330-338, 1922.

WRIGHT, S. The Theory of Path Coefficients: a reply to Niles's criticism. *Genetics* 8: 239-255, 1923.

WRIGHT, S. The Method of Path Coefficients. **The Annals of Mathematical Statistics**, vol 5, no3, 161-215, 1934.

Anexo I

FICHA DE DADOS CLÍNICOS PARA SOLICITAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Data: / / Local:
Registro: Responsável pelo atendimento:

Nome do paciente:
Data de Nascimento: / /
Endereço:
Telefone:
Nome do responsável:

Tipo de fissura:

Lábio:

- Unilateral esquerda
- Unilateral direita
- Bilateral

Palato:

- Palato duro:
  - Pré-forame incisivo (gengiva)
  - Pós-forame
- Palato mole
- Palato duro+mole
- Submucosa
- Agenesia de úvula
- Úvula bífida

Andou: ( ) antes dos 18 meses ( ) depois dos 18 meses
Deficiência intelectual ou dificuldade escolar: ( ) não ( ) sim
Distúrbios psiquiátricos/comportamentais: ( ) não ( ) sim
Voz anasalada: ( ) não ( ) sim
Cardiopatia (defeito do septo ventricular, tetralogia de Fallot, outras): ( ) não ( ) sim
Depressões em lábio inferior ("pits"): ( ) não ( ) sim
Outros achados clínicos? ( ) não ( ) sim
Especificar:_____

Pais são consangüíneos? ( ) não ( ) sim Grau de parentesco:_____
Número de irmãos do propósito:____
Ordem do nascimento do propósito (circular): 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, ...
Há outros afetados na família? ( ) não ( ) sim
Grau de parentesco:_____ Achado clínico:_____

Amostra coletada:
Esfregaço de mucosa oral: ( ) não ( ) sim
Bochecho com sacarose: ( ) não ( ) sim
Sangue periférico: ( ) não ( ) sim

Discussão Geral e Conclusões

A definição precisa do quadro clínico das fissuras orais é importante para conduta cirúrgica, acompanhamento clínico e estimativa de risco de recorrência, já que a depender da condição, os portadores podem vir a ter um alto risco de transmitir a alteração aos seus descendentes. Considerando-se a importância de realizar diagnósticos e aconselhamentos genéticos mais precisos, neste estudo, objetivamos investigar mecanismos genéticos, bem como a contribuição genética na determinação das fissuras palatinas, de forma que os resultados obtidos possam contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos etiológicos das fissuras orais, particularmente as formas não sindrômicas.

Em um primeiro trabalho, avaliamos o *IRF6* em 304 indivíduos portadores de FL±P ou FPNS, com história familial de fissura. Dentre os 35 SNV encontrados, 26 (74,3%) são conhecidas, (8 raras e 18 comuns), e 9 (25,7%) são variantes novas e raras. Destes 35 SNV, 8 estão em regiões codificantes (5 são sinônimos e 3 são *missense*) e 27 localizam-se em regiões não codificadoras. Dentre estas, houve uma única variante reconhecidamente patogênica para a SVW. A mutação reconhecidamente causativa da SVW, rs28942093 p.(Ala2Val), no exon 3, foi identificada em um único paciente com FP e pai com mesmo fenótipo (~0,3% dos casos). Não houve nenhuma evidência de fossetas no probando, porém demais familiares não foram avaliados clinicamente. Assim sendo, podemos considerar o presente caso como uma forma de SVW, onde não houve penetrância de fossetas labiais.

Ao comparar nossos resultados com um estudo anterior do nosso grupo, realizado por Jehee et al (2009), que encontrou uma prevalência de 3% de mutações potencialmente patogênicas no *IRF6*, após análise dos exons 3, 4 e 7 em 108 casos familiais de FL±P, supomos que esse maior número de mutações pode, em parte, ser atribuído ao maior número de afetados por famílias neste primeiro estudo ou ao tamanho amostral. Uma análise combinada dos dois estudos realizados por nosso grupo, resulta numa frequência de 4 mutações raras patogênicas em 383 casos seqüenciados para os exons 3, 4 e 7, equivalente a 1%. Uma frequência de 1% explicaria a falta de sucesso relatada por outros grupos que triaram o *IRF6* em um número relativamente pequeno de casos com FL±PNS como os estudos realizados por Zucchero et al. (2004), Pegelow et al., (2008), Birnbaum et al. (2008) ,Larrabee et al. (2011), Salahshourifar et al., (2012) e Chou et al. (2013), todos com tamanhoa amostral $\leq$ 100 indivíduos. Rutledge et al., (2010) detectaram 2 mutações patogênicas ao avaliaram famílias que segregavam FL±P e FP, corroborando a nossa sugestão

de que um dos critérios para a triagem para mutações no *IRF6* é que sejam incluídos casos familiais com fissuras mistas. Em um dos nossos 4 pacientes com fissuras, verificou-se uma forma frusta de pit, semelhante ao relatado por Desmyter et al., (2010) que detectou mutações patogênicas no *IRF6* em indivíduos com fossetas labiais atípicas. Assim sendo, uma outra recomendação é o estudo do *IRF6* quando houver dúvidas em relação ao exame clínico das fossetas labiais.

Observamos que a triagem dos outros exons, além do 3, 4 e 7, não pareceu ser relevante para a detecção de mutações patogênicas associadas à SVW, uma vez que apenas 1 mutação deste tipo foi identificada no exon 3, um dos exons mais freqüentemente envolvidos na detecção de mutações na SVW.

Dentre as 26 SNV conhecidas, 7 localizam-se em regiões codificantes (3 raras e 4 comuns) e 19 situam-se em regiões não codificantes (5 raras e 14 comuns).

Além da mutação patogênica encontrada rs28942093, entre as 7 variantes raras conhecidas restantes, merece destaque o SNV rs116094279, no íntron 7, que foi encontrada em 4/157 de nossos probandos e em nenhum dos 1730 cromossomos controle na população brasileira. Observamos que este SNV, nunca antes associado a FL±P, tem uma freqüência de 1% no grupo de etnia africana no *1000 genomas* e menor nas demais etnias, necessitando assim ser melhor avaliado em um estudo incluindo a ancestralidade.

Tem-se postulado que variantes comuns estejam associadas à predisposição destas fissuras baseando-se no modelo de doenças comuns-variantes comuns. Duas das variantes, dentre as 26 conhecidas encontradas, são citadas na literatura como de susceptibilidade a fissuras orofaciais: rs2235375, rs2235371. Quanto às variantes comuns, observamos uma possível associação entre rs2235371 e fissuras, porém, detectamos um excesso de afetados por fissura portando o alelo A (c.820A; p.274I), resultado contrário ao encontrado na maioria dos estudos anteriores que associam o alelo G (c.820G; p.274V) a fissuras. Por outro lado, não detectamos associação entre o SNV rs2235375 (conhecidamente associado ao aumento de suscetibilidade a FL±PNS) e pacientes fissurados em nossa população. Além disso, o SNV rs2235377, menos conhecido por sua associação com fissuras, mostrou evidências de associação na presente amostra, ao compararmos afetados com controles da população brasileira.

Em relação às 9 variantes novas detectadas, todas foram consideradas raras, e observamos uma prevalência de ~3,3% entre os pacientes, não havendo detecção nos controles brasileiros. Estas variantes apresentam significado clínico ainda desconhecido,

porém, após as análises in silico verificou-se que 8 entre estas 9 SNV, podem estar interferindo no controle de expressão do *IRF6*.

Diversos estudos, com diferentes populações, têm mostrado consistentemente associação positiva entre os variantes do *IRF6* e fissuras. Observamos que a maioria das variantes encontradas no presente estudo localizam-se em regiões não codificadoras, o que é o esperado, uma vez que as regiões intrônicas estão sob menor pressão seletiva, porém, houve uma maior frequência de mutações na região 5'UTR nos afetados. Ainda, observamos um excesso de variantes na região 5´UTR nos afetados por fissura quando comparados aos controles brasileiros, o que sugere que estas tenham um efeito funcional na regulação do *IRF6*.

A avaliação de nossos resultados sugere que a triagem do *IRF6* para pacientes com FL±P e FP NS seja indicada de forma criteriosa, para os casos com história familial de fissura, famílias segregando FP e FL±P concomitantemente ou presença de fossetas labiais atípicas.

Este estudo pode contribuiu para conhecimento dessa malformação frequente e ajudou na identificação de características herdadas que contam para um aumento da suscetibilidade individual no distúrbio multifatorial que representa as fissuras NS e mostra a importância de se estudar o efeito dos diversos tipos de mutação no *IRF6* em pacientes com fissuras orais.

Em um segundo trabalho, que objetivou estudar as FPNS, verificamos que são raros os estudos epidemiológicos e de herdabilidade, quando comparadas às FL±PNS. Tais estudos têm o potencial de fornecer informações relevantes que podem contribuir para o delineamento de estudos genéticos e de investigação de causas ambientais. A compreensão sobre a participação dos fatores genéticos e ambientais na etiologia das FP em nossa população, pode auxiliar na definição de estratégias de prevenção destas malformações.

Tendo em vista a escassez de dados epidemiológicos para FPNS na literatura, em particular no Brasil, as estimativas da consanguinidade, risco de recorrência e herdabilidade realizada pelo presente estudo para as FPNS, podem contribuir para a compreensão dos mecanismos etiológicos destas malformações em nossa população.

Foi possível verificar, em uma população de fissurados com FPNS com tamanho amostral de 331 indivíduos procedentes de 4 diferentes regiões do Brasil, que a taxa de consanguinidade bem como o *F* de quatro das cinco populações com FPNS avaliadas neste estudo foram similares quando comparadas às populações controles brasileiras estudadas nas mesmas localidades (FREIRE-MAIA, 1957). Estes resultados, portanto, sugerem que o endocruzamento não está contribuindo de maneira significativa para a etiologia das FPNS na maioria das populações estudadas.

A proporção de casos familiais foi similar aos dados da literatura, porém, a proporção de parentes em I grau com fissuras no presente estudo foi menor do que em outros trabalhos que avaliaram populações americanas e francesas. Atribuímos estas diferenças, pelo menos parcialmente, à maior proporção de parentes em I grau/ probando em nossa população.

Por outro lado, os riscos de recorrência para irmãos dos probandos (~1.5%) foram ligeiramente inferiores aos de outros estudos populacionais (~3%). Este maior valor pode ser decorrente da inclusão de pacientes sindrômicos nos outros estudos populacionais que avaliaram recém-nascidos.

Uma alta herdabilidade foi estimada (95,81%), semelhante aos altos valores encontrados em estudos realizados na Dinamarca que estudaram uma população com maior tamanho amostral para FPNS, o que sugere grande atuação de componentes genéticos na etiologia das FP nestas populações.

Estes resultados sugerem a validade de maiores investimentos na identificação dos fatores genéticos para as FPNS. A identificação de tais fatores pode, no futuro, contribuir para delimitação estratégias de pesquisa em saúde pública para reduzir a prevalência de novos casos de FPNS.

Resumo

As fissuras orais são as malformações craniofaciais mais freqüentes ao nascimento e apresentam incidências variáveis entre as diversas populações. Essas fissuras são subdivididas em dois grupos principais, as fissuras labiais com ou sem fissura de palato (FL±P) e as fissuras palatinas (FP), consideradas entidades distintas do ponto de vista embriológico, epidemiológico e etiológico. Estas malformações podem ser classificadas em sindrômicas ou não sindrômicas (NS) a depender da existência de outras alterações clínicas associadas. Para as FL±PNS e FPNS, o padrão de herança multifatorial e o modelo "doenças comuns-variantes comuns" foram propostos. Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de se identificar os fatores genéticos de predisposição a estas malformações, particularmente para as FL±PNS. Entre estes fatores, o *IRF6*, comprovadamente associado à síndrome de Van der Woude (SVW), é um gene candidato associado às fissuras NS. Em algumas situações, a SVW torna-se clinicamente indistinguível das fissuras não sindrômicas, o que pode dificultar o aconselhamento genético destas famílias afetadas por fissuras. A associação entre FL±P e variantes comuns no *IRF6* tem sido observada em vários estudos em diferentes populações, porém os resultados obtidos não explicam a alta herdabilidade das FL±P. Frente a este quadro, foi proposto mais um modelo genético para as fissuras NS, o modelo de "doenças comuns-variantes raras". Diante destas questões, o presente trabalho foi realizado para tentar avaliar o impacto fenotípico de variantes no *IRF6* em famílias com fissuras NS, através da verificação da ocorrência de mutações patogênicas, do tipo perda de função no *IRF6*, causativas da SVW entre casos não sindrômicos e da identificação da associação de variantes do *IRF6* raras e comuns à predisposição de fissuras NS em casos familiais. Para testarmos estas hipóteses, foi realizado o sequenciamento do *IRF6* em 304 pacientes com fissuras orais, não relacionados entre si, e com história familiar positiva para fissuras. Os resultados foram comparados com controles da população brasileira e com bancos de dados internacionais. A avaliação dos resultados sugere uma freqüência de aproximadamente 1% de mutações patogênicas para SVW entre os casos não sindrômicos familiais. Foram também encontradas variantes novas raras, de significado clínico ainda desconhecido, em 3,3% dos casos e observamos um excesso de variantes na região 5'UTR entre os fissurados sugerindo que estas tenham um efeito funcional na regulação do *IRF6* e eventual envolvimento com a ocorrência das fissuras orais NS. Além disso, foram detectadas novas associações com fissuras NS entre as variantes comuns já conhecidas. Além da análise mutacional do *IRF6* entre pacientes com FL±P e FP, estudamos as FP isoladamente, com o objetivo de verificar a contribuição

genética nas fissuras palatinas não sindrômicas, através de um estudo epidemiológico. Entende-se que estes estudos podem fornecer informações relevantes para o delineamento de estudos genéticos e para associações com possíveis fatores ambientais predisponentes à malformação. Entretanto, há um número limitado de estudos epidemiológicos sobre FP na literatura e em particular no Brasil, por isso, objetivamos estimar dados relacionados à consanguinidade, risco de recorrência e herdabilidade das FPNS a partir de uma amostra de 331 casos de FPNS na população brasileira. A frequência de casamentos consanguíneos foi semelhante à da população controle e os riscos de recorrência para irmãos dos probandos (~1,5%) foi menor que o estimado na literatura mundial. Foi estimada uma herdabilidade de 95,81%, o que sugere grande atuação de componentes genéticos na etiologia das FP nesta população. Estes resultados sugerem a validade de maiores estudos na identificação dos fatores genéticos para as FPNS e demonstram a importância de se estudar o efeito dos diversos tipos de variantes no *IRF6* em pacientes com fissuras orais.

Palavras-chave: Fissuras labiais e palatinas; Síndrome de Van der Woude; *IRF6*; Herdabilidade; fissuras não sindrômicas; fissuras sindrômicas.

Abstract

Oral clefts are the most common congenital craniofacial malformation and have different incidences rates among different populations. These oral clefts are subdivided into two main groups, cleft lip with or without palate cleft (CL±P) and cleft palate (CP), regarded as separate entities from embryological, epidemiological and etiological perspectives.These malformations are classified into syndromic or nonsyndromic (NS) depending on the existence of other associated clinical changes. For NSCL±P and NSCP, the multifactorial inheritance pattern and the "common disease-common variants" model have been proposed. Several studies have been conducted in an attempt to identify the genetic factors predisposing to these malformations, particularly for NSCL±P. Among these factors, the *IRF6*, demonstrably associated with Van der Woude (SVW) syndrome, is a candidate gene associated to NS clefts. In some situations, SVW becomes clinically indistinguishable from nonsyndromic clefts, which can hamper genetic counseling of cleft affected families.The association between CL±P and *IRF6* common variants has been observed in several studies in different populations, but the results do not explain the high heritability of CL±P. Thus, an additional Another genetic model was proposed for NS clefts, the "common disease-rare variant" model. Given these issues, the present study tries to assess the phenotypic impact of variants in *IRF6* in families with NS clefts by verifying the occurrence of loss-of-function mutations in *IRF6*, causative of SVW among nonsyndromic cases and also by the indentification of rare and common *IRF6* variants predisposing NS clefts in familial cases. To test these hypotheses, the sequencing of *IRF6* was performed for 304 unrelated cases of oral clets, with positive family history of clefts. results were compared with Brazilian population controls as well as international databases. The results suggests a prevalence of 1% for pathogenic mutations of SVW among nonsyndromic familial cases. It was also observed new rare variants of still unknown clinical significance in 3.3% of cases and it was observed an excess of variants in the 5'UTR region among the cleft cases suggesting that they have a functional effect on the regulation of *IRF6*. Furthermore, new associations with NS clefts were detected among common variants already known. Besides mutational analysis of *IRF6* for patients with CL±P and CP, the CP cases were studied, in order to verify the genetic contribution in nonsyndromic CP, by means of an epidemiological study. It is understood that these studies may provide relevant information for genetic study guidelines and for possible associations with environmental factors predisposing the malformation. However, there is a limited number of epidemiological studies on CP in the literature and mainly in Brazil, so this

study also aims to estimate data related to inbreeding, recurrence risk and heritability of NSCP from a sample of 331 cases from a Brazilian population. The frequency of consanguineous marriages was similar to the control frequency and recurrence risks for siblings of probands (about 1.5%) was lower than estimated in the literature. A heritability of 95.81% was estimated, suggesting a high genetic component interaction in the etiology of CP in this population. Finally these results indicate the relevance of further studies on the identification of genetic factors for NSCP and demonstrate the importance of studying the effect of different types of variants in *IRF6* in patients with oral clefts.

Key words: Cleft lip and palate; Van der Woude syndrome; *IRF6*; Heritability; non-syndromic clefts; syndromic clefts.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas:

ARDINGER, H. H. *et al.* Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet*, 45 (3): 348-53, 1989.

BEATY, T. H. *et al.* A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Ann Epidemiol*, 11(6):434-42. Aug, 2001.

BEATY, T. H. *et al.* Evidence for gene-environment interaction in a genome wide study of nonsyndromic cleft palate. *Genet Epidemiol*, 35 (6): 469-78, 2011.

BEATY, T.H. *et al.* A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet* , 42 (6): 525-9, 2010.

BEN, J.; JABS, E. W.; CHONG, S. S. Genomic, cDNA and embryonic expression analysis of zebrafish *IRF6*, the gene mutated in the human oral clefting disorders Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Gene Expression Patterns*, 5 (5): 629–638, 2005.

BENDER, P. L. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs*, 15 (4): 242-9, 2000.

BIRNBAUM, S. et al. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nature Genetics*. v. 41, n. 4, p. 473-477, 2009a.

BIRNBAUM, S. *et al.* *IRF6* gene variants in Central European patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci*, 117 (6): 766-9, 2009b.

BLANTON, S.; et al. Variation in *IRF6* contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *American Journal of Medical Genetics*, v. 137, p. 259–262, 2005.

BODMER, W.; BONILLA, C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. Nat. Genet. v. 40, n. 6, p. 695-701, 2008.

BOYLES, A. *et al.* Genetic Determinants of Facial Clefting: Analysis of 357 Candidate Genes Using Two National Cleft Studies from Scandinavia. *Plos ONE*, 4 (4), 2009.

BREWER, C. *et al.* A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality-and tolerance of segmental aneuploidy-in humans. *Am J Hum Genet*, 64 (6): 1702-8, 1999.

BRITO, L. A. *et al.* Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. *Am J Med Genet Part A*, 155:1581-1587, 2011.

BRITO, L. A. et al. Region 8q24 is a susceptibility locus for nonsyndromic oral clefting in Brazil. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. v. 94, p. 464-468, 2012b.

BRITO, L.A. *et al.* Genetics and Management of the Patient with Orofacial Cleft. *Plastic Surgery International*, vol. 2012. Article ID 782821, 11 pages, 2012. doi

BRITO, L. A. et al. *IRF6* is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population. *American Journal of Medical Genetics*: Part A. v. 158A,p. 2170–2175, 2012a.:10.1155/2012/782821

BUDARF. Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse Tbx1 gene. *Genomics*, 43 (3): 267-77, 1997.

BURDICK, A. B.; BIXLER, D.; PUCKETT, C. L. Genetic analysis in families with Van Der Woude syndrome. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, 5 (2): 181–208, 1985.

CARINCI, F. *et al.* Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update" ; *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 71 (10):1509-19, 2007.

CARLSON, C. *et al.* Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients; *Am J Hum Genet*, 61 (3): 620-9, 1997.

CHIEFFO, C. et al. Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse Tbx1 gene. *Genomics*, 43 (3): 267-77, 1997.

CHRISTENSEN, K.; MITCHELL, L. E. Familial recurrence-pattern analysis of nonsyndromic isolated cleft palate--a Danish Registry study. *Am J Hum Genet*, 58 (1): 182-90, 1996.

DE LIMA R.L. et al. Prevalence and nonrandom distribution of exonic mutations in interferon regulatory factor 6 in 307 families with Van der Woude syndrome and 37 families with popliteal pterygium syndrome. Genet Med,11(4):241-7.2009.

DISSEMOND, J. *et al.* The Van der Woude syndrome: a case report and review of the literature. J Eur Acad Dermatol Venereol 18: 611-613, 2004.

DIXON, M. *et al.* Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*, 12: 167-178, 2011.

DIXON, M. J. *et al*. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*, 12 (3): 167-78, 2011.

DURDA, K. M.; SCHUTTE, B. C.; MURRAY, J.C.; *IRF6*-Related Disorders. 1993.

EIBERG, H. *et al.* Suggestion of linkage of a major locus for nonsyndromic orofacial cleft with F13A and tentative assignment to chromosome 6. *Clin Genet*, 32 (2): 129-32, 1987.

EPPLEY, B.L. *et al.* , 2005 The Spectrum of Orofacial Clefting. Plast.Reconstr. Surg. 115: 101e, 2005.

FITZPATRICK, D. & FARRALL, M. An estimation of the number of susceptibility loci for isolated cleft palate. *J Cranifac Genet Dev Biol*, 13: 230-235, 1993.

FRASER, F.C. The Genetics of Cleft Lip and Cleft Palate. *Am J Hum Genet*.;22 (3):336-52. May,1970.

FROSTER-ISKENIUS. Popliteal pterygium syndrome. *J Med Genet*., 27(5):320-6, May1990.

GABRIELLI, S. *et al.* Bilateral cleft lip and palate without premaxillary protrusion is associated with lethal aneuploidies ; *Ultrasound Obstet Gynecol*, 34 (4): 416-8, 2009.

GHASSIBE, M. *et al. S*ix families with van der Woude and/or popliteal pterygium syndrome: all with a mutation in the *IRF6* gene. *J Med Genet*, 41: e15. 2004.

GHASSIBE-SABBAGH, M. *et al.* FAF1; a gene that is disrupted in cleft palate and has conserved function in zebrafish. *Am J Hum Genet*, 88 (2): 150-61, 2011.

GORLIN RJ, SEDANO HO, CERVENKA J. Popliteal pterygium syndrome. A syndrome comprising cleft lip-palate, popliteal and intercrural pterygia, digital and genital anomalies. *Pediatrics*,41(2):503-9, Feb 1968.

GORLIN, R.J.; COHEN JR, M.M.; HENNEKAM, R.C.M. **Syndromes of the Head and Neck**, 4th edition, 1283, Oxford University Press, New York, 2001.

GROSEN, D. *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*, 47 (3): 162-8, 2010.

GROSEN, D. *et al.* Risk of oral clefts in twins. *Epidemiology*, 22 (3): 313-9, 2011.

HAMAMOTO J, & MATSUMOTO T. A case of facio-genito-popliteal syndrome. *Ann Plast Surg.*;13(3):224-9. 1984

HARPER, P. S. **Oral and craniofacial disorders. Practical Genetic Couselling**. 6th edition. London: Arnold Press. P 231, 2004.

HARVILLE, E. W. et al. Cleft lip and palate versus cleft lip only: are they distinct defects? Am J Epidemiol, v.162, n.5, Sep 1, p.448-53. 2005.

JIANG, R.; BUSH, J.O.; LIDRAL, A.C.; Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn*, 235 (5): 1152-66, 2006.

JONES, J. L. *et al.* Wound complications after cleft repair in children with Van der Woude syndrome. *J Craniofac Surg*, 21 (5): 1350-3, 2010.

JUGESSUR *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.

JUGESSUR, A. *et al.* Genetic determinants of Facial Clefting: Analysis of 357 Candidate Genes Using Two National Cleft Studies from Scandinavia. *Plos ONE*, 4 (4), 2009.

JUGESSUR, A.; MURRAY, J.C. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15: 270–278, 2005.

KERRIGAN, J.J.; *et al.* ; Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. *J R Coll Surg Edinb*, 45 (6): 351-8, 2000.

KNIGHT, A. S. *et al.* Developmental expression analysis of the mouse and chick orthologues of *IRF6*: The gene mutated in Van der Woude syndrome. *Dev. Dyn*., 235: 1441–1447, 2006.

KOILLINEN, H. *et al.* A genome-wide scan of non-syndromic cleft palate only (CPO) in Finnish multiplex families. *J Med Genet*, 42 (2): 177-84, 2005.

KOILLINEN, H. *et al.* Mapping of the second locus for the Van der Woude syndrome to chromosome 1p34. *Eur J Hum Genet*, 9: 747–752, 2001.

KONDO, S. *et al.* Mutations in *IRF6* cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet*, 32 (2): 285-9, 2002.

KOT, M.; KRUK-JEROMINI, J. Analysis of family incidence of cleft lip and/or palate. *Med Sci Monit*, 13 (5): CR231-4, 2007.

LAMMER, E. J. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) genetic variants, maternal smoking, vitamin use, and risk of human orofacial clefts. *Am J Epidemiol*, 162 (12): 1207-14, 2005.

LESLIE, E.; MURRAY, J. Evaluating rare coding variants as contributing causes to non-syndromic cleft lip and palate. Clin Genet. 2012

LIE, R. T.; WILCOX, A. J.; SKJAERVEN, R. A population-based study of the risk of recurrence of birth defects. *N Engl J Med*, 331 (1): 1-4, 1994.

LIMA R. L. *et al.* Prevalence and nonrandom distribution of exonic mutations in interferon regulatory factor 6 in 307 families with Van der Woude syndrome and 37 families with popliteal pterygium syndrome. *Genetics IN Medicine*, 11 (4), 2009.

LITTLE, J.; CARDY, A.; MUNGER, R. G. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. Bull. *World Health Organ*, 82: 213–218, 2002.

LOPEZ-CAMELO, J,S. et al. Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. Am J Med Genet A. t;152A(10):2444-58, 2010. doi: 10.1002/ajmg.a.33479.

MANGOLD, E. *et al.* Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet*, 42 (1): 24-6, 2009.

MANGOLD, E.; LUDWIG, K.U.; NOTHEN, M. M. Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. *Trends in Molecular Medicine*, 17 (12), 2011.

MARAZITA, M. L. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. 13:263-83, 2012.

MARÇANO, A.C. *et al.* TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate. *J Med Genet*.;41(1):68-74. 2004.

MARIAN, A. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Translational Research*, 159 (2): 64-78, 2012.

MENEGOTTO, B. G.; SALZANO, F. M. Epidemiology of Oral Clefts in a large south American Sample. *Cleft Palate Craniofac J*, 28 (4): 373-6; discussion 376-7, 1991.

MERSCHER, S. *et al.* TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell*, 104 (4): 619-29, 2001.

MOSSEY, P. A. *et al.* Cleft lip and palate. *Lancet*, 21; (9703):1773-85, 2009.

MOSSEY, P.; CASTILLA, E. Global registry and database on craniofacial anomalies. In World Health Organization Registry Meeting on Craniofacial Anomalies Bauru, Brazil, 2001.

MOSSEY, P.; CASTILLIA, E. Global registry and database on craniofacial anomalies. Relatório da Reunião da Organização Mundial de Saúde em Anomalias Craniofaciais, Geneva, 2003.

MOSSEY, P.; LITTLE, J.; MUNGER, R.; DIXON, M.; SHAW, W. Cleft lip and palate. *The Lancet*, 374: 1-13, 2009.

MURRAY *et al.* Linkage of an autosomal dominant clefting syndrome (Van der Woude) to loci on chromosome qi. Am J Hum Genet, 46(3):486-91, Mar 1990.

MYRIAM PEYRARD-JANVID *et al.* Dominant Mutations in GRHL3 Cause Van der Woude Syndrome and Disrupt Oral Periderm Development. *The American Journal of Human Genetics*, 94: 23–32, 2014.

NEILSON, D. E. *et al.* Mixed clefting type in Rapp-Hodgkin syndrome; *Am J Med Genet*, 108 (4): 281-4, 2002.

NORDSTROM, R. E. *et al.* Cleft-twin sets in Finland 1948-1987; *Cleft Palate Craniofac J*, 33 (4): 340-7, 1996.

ONOFRE, M.A.; BROSCO, H.B.; TAGA, R. Relationship between lower-lip fistulae and cleft lip and/or palate in van der Woude syndrome. Cleft Palate Craniofac J. 34(3): 261-265, 1997.

PASSOS-BUENO, M.R. et al. Transforming growth factor-alpha and nonsyndromic cleft lip with or without palate in Brazilian patients: results of a large case-control study. *Cleft Palate Craniofac* J, 41(4):387-91, Jul, 2004.

RADHAKRISHNA, U. *et al.* Genomewide scan for nonsyndromic cleft lip and palate in multigenerational Indian families reveals significant evidence of linkage at 13q33.1-34. *Am J Hum Genet*, 79 (3): 580-5, 2006.

RAHIMOV, F. *et al.* Disruption of an AP-2a binding site in an *IRF6* enhancer is associated with cleft lip. *Nature Genetics*, 40: 1341-1347, 2008.

RINTALA, A. E., & RANTA, R. (1981). Lower lip sinuses. I. Epidemiology, microforms and transverse sulci. Br. J. Plastic Surg. 34: 26-30, 1981.

RIZOS M, SPYROPOULOS, MN. van der Woude syndrome: a review. Cardinal signs, epidemiology, associated features, differential diagnosis, expressivity, genetic counselling and treatment. *Eur J Orthod*., 26: 17-24. 2004.

RUTLEDGE, K. D. *et al.* *IRF6* mutations in mixed isolated familial clefting. *Am J Med Genet A*, 152A (12): 3107-9, 2010.

S. BEIRAGHI *et al.* Possible localization of a major gene for cleft lip and palate to 4q ; *Clin Genet*, 46 (3): 255-6, 1994.

SAMAM, M.& TATUM, S.A III. Recent advances in surgical pharyngeal modification procedures for the treatment of velopharyngeal insufficiency in patients with cleft palate,"

Archives of Facial Plastic Surgery, vol. 14, no. 2, pp. 85–88,2012.

SANDRIN-GARCIA, P. *et al.* Typical phenotypic spectrum of velocardiofacial syndrome occurs independently of deletion size in chromosome 22q11.2. *Mol Cell Biochem*, 303 (1-2): 9-17, 2007.

SATOKATA, I.; MAAS, R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*, 6, (4): 348-56, 1994.

SCAMBLER,P.J. The 22q11 deletion syndromes. *Hum Mol Genet*. 2000 Oct;9(16):2421-6.

SCAPOLI, L. *et al.* Expression and association data strongly support JARID2 involvement in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat*, 31 (7): 794-800, 2010.

SCHUTTE, B. C. *et al.* Refinement of the Van der Woude gene location and construction of a 3.5-Mb YAC cotig and STS map spanning the critical region in 1q32-q41. *Genomics*, 36 (3): 507-14, 1996.

SCHUTTE, B. C.; MURRAY, J. C. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet*, 8 (10): 1853-9, 1999.

SCHUTTE, B.C. *et al.* A preliminary gene map for the Van der Woude syndrome critical region derived from 900 kb of genomic sequence at 1q32-q41. *Genome Res,* 10: 81–94, 2000.

SHI, M. *et al.* Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *Am J Hum Genet*, 80 (1): 76-90, 2007.

SHPRINTZEN, R. J. *et al.* A new syndrome involving cleft palate ; cardiac anomalies ; typical facies ; and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J*, 15 (1): 56-62, 1978.

SHPRINTZEN, R. J. *et al.* Late-onset psychosis in the velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet*, 42 (1): 141-2, 1992.

SIVERTSEN, A. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ*, 336 (7641): 432-4, 2008.

SOMMERLAD, B.C. Management of cleft lip and palate. *Current Paediatrics* , 4. 189-195, 1994.

SOMMERLAD, B.C. *et al.* Palate re-repair revisited. *Cleft Palate Craniofac J,* 39 (3): 295-307, 2002.

STANIER, P.; MOORE, G. E. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet*, 13 (1): R73-81, 2004.

STEIN, J. *et al.* Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families. *Am J Hum Genet*, 57 (2): 257-72, 1995.

STEVENSON, R. E.; HALL, J.G. **Human malformations and related anomalies**. 2nd edition. Oxford University Press, 2006.

STRONG, E.B. & BUCKMILLER, L.M. Management of the cleft palate. *Facial Plast Surg Clin.*, North Am., 9(1):15-25, vii, Feb 2001.

TESSIER, P. Anatomical classification facial, cranio-facial and latero-facial clefts. J Maxillofac Surg., 4(2):69-92, Jun 1976.

TOLAROVA, M.; VAN ROOIJ, I.; PASTOR, M. A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for nonsyndromic cleft lip and palate anomalies. *Am J Hum Genet*, 63: 27, 1998.

VAN DEN BOOGAARD, M.J. et al. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. Nat Genet,24(4):342-3, Apr 2000.

VAN DER MEULEN, J.C. et al., A morphogenetic classification of craniofacial malformations. Plast Reconstr Surg.,71(4):560-72, Apr 1983.

VAN DER WOUDE, A. Fistula labii inferioris congenita and its association with cleft lip and palate. *Am. J. Hum. Genet*, 6: 244–256, 1954.

VAN ROOIJ, I. A. *et al.* Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environment interaction. *Epidemiology*, 12 (5): 502-7, 2001.

WEHBY, G.L. & MURRAY, J.C. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Dis*. 16(1):11-9, Jan 2010.

WEHBY, G.L. et al. High dosage folic acid supplementation, oral cleft recurrence and fetal growth. *Int J Environ Res Public Health*. 4;10(2):590-605, Feb 2013.

WEINBERG, S. M. *et al.* Rethinking Isolated Cleft Palate: Evidence of Occult Lip Defects in a Subset of Cases. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 146A: 1670–1675, 2008.

WYSZYNSKI, 1997

WYSZYNSKI, D.F. & WU, T. Use of US birth certificate data to estimate the risk of maternal cigarette smoking for oral clefting. *Cleft Palate Craniofac J.,* Mar;39(2):188-92, Mar 2002.

ZIAI, M.N.; BENSON, A.G., DJALILIAN, H.R. Congenital lip pits and van der Woude syndrome. *J Craniofac Surg*., 16: 930-932, 2005.

ZUCCHERO, T. *et al.* Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *The New England Journal of Medicine*,351: 769-780, 2004.