



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES *IRF6* E *GRHL3* EM
INDIVÍDUOS PORTADORES DE FISSURAS DE LÁBIO E/OU PALATO
NÃO SINDRÔMICAS**

BETÂNIA SEVERINO DA SILVA MARANHÃO

GOIÂNIA-GO

2016

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: **Betânia Severino da Silva Maranhão**

Título do trabalho: **ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES *IRF6* E *GRHL3* EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE FISSURAS DE LÁBIO E/OU PALATO NÃO SINDRÔMICAS**

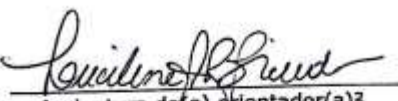
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO¹**

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 06 / 06 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BETÂNIA SEVERINO DA SILVA MARANHÃO

**ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES *IRF6* E *GRHL3* EM
INDIVÍDUOS PORTADORES DE FISSURAS DE LÁBIO E/OU PALATO
NÃO SINDRÔMICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás para a obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Bioquímica e Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

**GOIÂNIA-GO
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Maranhão, Betânia Severino da Silva
ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES IRF6 E GRHL3 EM
INDIVÍDUOS PORTADORES DE FISSURAS DE LÁBIO E/OU
PALATO NÃO SINDRÔMICAS [manuscrito] / Betânia Severino da Silva
Maranhão. - 2016.
xiv, 95 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo; co
orientadora Dra. Jalsi Tacon Arruda.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2016.
Bibliografia. Anexos.

1. fissura de lábio e/ou palato. 2. polimorfismo. 3. GRHL3. 4.
IRF6. 5. malformação. I. Arilho Ribeiro Bicudo, Lucilene, orient. II. Título.

CDU 575

ATA DA DEFESA PÚBLICA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 452

1 Aos vinte e seis dias do mês de outubro do ano de dois mil e dezesseis, às
2 catorze horas e trinta minutos, no Anfiteatro do Instituto de Ciências
3 Biológicas II da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes
4 da banca examinadora: Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo, Profa. Dra.
5 Nádia Aparecida Bérnago e Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araujo para,
6 em sessão pública presidida pela primeira examinadora citada, procederem à
7 avaliação da defesa de dissertação intitulada "ANÁLISE MUTACIONAL DOS
8 GENES IRF6 E GRHL3 EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE FISSURAS DE LÁBIO
9 E/OU PALATO NÃO-SINDRÔMICAS", em nível de mestrado, área de
10 concentração em Bioquímica e Genética, de autoria de **Betânia Severino da**
11 **Silva Maranhão**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências
12 Biológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela
13 presidenta, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra,
14 a seguir, foi concedida à autora da dissertação que em cerca de 40
15 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação,
16 cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de
17 diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da
18 dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1340 de 2015 do
19 Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o
20 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi
21 APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para
22 fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade
23 Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão
24 definitiva da dissertação na Secretaria do programa, com as devidas correções
25 sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da
26 defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às _____ horas e _____
27 minutos, encerrou-se a sessão de defesa de dissertação e, para constar, eu,



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

29 Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da Secretaria de Pós-
30 graduação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de
31 Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos
32 membros da banca examinadora em três vias de igual teor.

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48


Prof. Dr. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo
Presidenta da Banca
Universidade Federal de Goiás


Profa. Dra. Nádia Aparecida Bérnago
Universidade Federal de Goiás


Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araujo
Universidade de Brasília

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Nádia Aparecida Bérghamo
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Juliana Mazzeu
Universidade de Brasília

Aprovada em: 26 de outubro de 2016.

Dedicatória

A Deus que me ajuda e está presente em todos os momentos da minha vida, guiando e dando sabedoria, me proporcionando essa chance de pesquisa e estudo nessa existência.

A meu pai e minha mãe que sempre me deram condições para estar onde estou.

A meus filhos, Paulo Henrique e Ana Rita, pelo simples fato de existirem e me incentivarem com isso a ser uma pessoa melhor.

Ao meu marido pelo apoio, presença e companheirismo.

Agradecimentos

Esta dissertação foi realizada com a participação e apoio de muitas pessoas e Instituições dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

A *Jalsi Tacon Arruda*, minha co-orientadora, meu anjo da guarda, a pessoa que me aproximou desse caminho maravilhoso que é a pesquisa e acima de tudo MINHA AMIGA!

A minha orientadora *Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo* por ter me dado essa oportunidade e esse maravilhoso projeto;

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, pelo carinho e companheirismo, apoio, amizade e por estar sempre dispostos a dividir o que sabem, em especial a *Camila* (Camilinha), *Roberta*, *Lucas*, *Thallita*, *Juliana* e a professora *Elisângela*;

As professoras *Daniela de Melo e Silva* e *Nádia Aparecida Bérghamo* pela participação na banca de qualificação;

A professora *Mariana Pires de Campos Telles*, do LGBio, por ceder o laboratório para as análises e pelo carinho;

A *Fernando Almas*, presidente da Reface, um grande amigo, que “abriu a porta” para eu chegar aos pacientes;

A *Naianne*, secretária da Reface, pelo carinho, disposição e amizade;

A todos os “*meus*” pacientes e seus familiares que se dispuseram, com tanto desprendimento e generosidade, a participar desta pesquisa e, conseqüentemente, contribuíram para o crescimento da ciência;

A *CAPES* pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas* da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu profundo agradecimento.

Obrigada!

EPÍGRAFE

“Se vi mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes.”

Isaac Newton

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas e Siglas	xiii
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvi
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Embriologia Craniofacial	20
1.1.1 Desenvolvimento da Face	21
1.1.2 Desenvolvimento do Palato	22
1.2 Características Gerais das Fissuras Orais	23
1.3 Epidemiologia	25
1.4 Fatores Ambientais	26
1.5 Fatores Genéticos	27
1.5.1 Gene <i>IRF6</i>	29
1.5.2 Gene <i>GRHL3</i>	32
1.6 Herança	34
1.7 Técnica de MLPA – <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	35
2. OBJETIVOS	37
3. METODOLOGIA	38
3.1 Casuística	38
3.2 Extração de DNA	38
3.3 Análise por MLPA	39
3.4 Análise dos Dados Obtidos	41
4. RESULTADOS	43
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	54
7. REFERÊNCIAS	55
8. ANEXOS	68
Anexo 1. Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás	68
Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	73
Anexo 3. Termo de Assentimento Livre e Esclarecido	75
Anexo 4. Questionário de anamnese dos indivíduos portadores de fissura não síndrômica.	74

Anexo 5. Tabela com dados de cada paciente analisado	78
Anexo 6. Artigo submetido ao Journal of Dental Research	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
<i>AP-2α</i>	Proteína que atua como fator de ligação de DNA numa sequência específica
<i>AP-2αP</i>	Fator de transcrição da proteína AP-2 α
b	Bases nitrogenadas
CEP-UFG	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás
CRISPLD2	<i>Cysteine-Rich Secretory Protein LCCL Domain Containing 2</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECLAMC	Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
et al	Colaboradores
FG1	Tampão 1 do kit de extração de DNA
FG2	Tampão 2 do kit de extração de DNA
FG3	Tampão 3 do kit de extração do DNA
<i>FGF8</i>	Fator 8 de crescimento fibroblástico
<i>FGFR1</i>	Receptor 1 do fator de crescimento fibroblástico
<i>FGFR2</i>	Receptor 2 do fator de crescimento fibroblástico
FL	Fissura labial
FL/P	Fissuras de lábio e/ou palato
<i>FOXE1</i>	<i>Forkhead Box E1</i>
G	Força gravitacional
<i>GABRB3</i>	<i>Gamma-Aminobutyric Acid A Receptor, Beta 3</i>
<i>GLI2</i>	<i>GLI Family Zinc Finger 2</i>
GO	Goiás
<i>GRHL1</i>	<i>Grainyhead-like transcription factor 1</i>
<i>GRHL2</i>	<i>Grainyhead-like transcription factor 2</i>
<i>GRHL3</i>	<i>Grainyhead-like transcription factor 3</i>
<i>IRF6</i>	<i>Interferon Regulatory Factor 6</i>
<i>JAG2</i>	<i>Jagged 2</i>
kDa	kiloDaltons
<i>LHX8</i>	<i>LIM Homeobox 8</i>
mg	Miligrama
Min	Minutos

mL	Mililitros
MLPA	<i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i>
<i>MSX1</i>	<i>Msh Homeobox 1</i>
<i>MSX2</i>	<i>Msh Homeobox 2</i>
<i>MTHFR</i>	<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase (NAD(P)H)</i>
ng	Nanograma
nt	Nucleotídeos
°C	Graus Celsius
P.A.	Puro e absoluto, para análises
PA	Pará
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
<i>PDGFC</i>	<i>Platelet Derived Growth Factor C</i>
pter	Região terminal do braço curto do cromossomo
<i>PVRL1</i>	<i>Poliovirus Receptor-Related 1 (Herpesvirus Entry Mediator C)</i>
<i>RARA</i>	<i>Retinoic Acid Receptor, Alpha</i>
REFACE	Associação de Combate às Deformidades Faciais
<i>SATB2</i>	<i>SATB Homeobox 2</i>
<i>SKI</i>	<i>SKI Proto-Oncogene</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPP	Síndrome Pterígio poplíteo
<i>SPRY2</i>	<i>Sprouty RTK Signaling Antagonist 2</i>
SVW	Síndrome de van der Woude
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
<i>TBX10</i>	<i>T-Box 10</i>
<i>TBX22</i>	<i>T-Box 22</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>TFAP2A</i>	<i>Transcription factor AP-2α</i>
TGFA	<i>Transforming growth factor, alpha</i>
TGFB3	<i>Transforming growth factor, beta 3</i>
UV	Ultravioleta
V274I	Substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 274

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Desenvolvimento embrionário da face envolvendo o lábio.....	21
Figura 2. Desenvolvimento embrionário da face envolvendo o palato.....	22
Figura 3. Desenho esquemático do lábio e palato	24
Figura 4. Posição de leitura do gene <i>IRF6</i>	29
Figura 5. Localização do gene <i>IRF6</i> no cromossomo	29
Figura 6. Estrutura dos exons do gene <i>IRF6</i>	29
Figura 7. Posição de leitura do gene <i>GRHL3</i>	32
Figura 8. Localização do gene <i>GRHL3</i> no cromossomo	32
Figura 9. Representação esquemática das etapas da reação de MLPA descritas pelo fabricante	36
Figura 10. Gráficos gerados pelos programa Genemarker e Coffalyser da análise do MLPA. Indivíduo CF185	44
Figura 11. Gráficos gerados pelos programa Genemarker e Coffalyser da análise do MLPA. Indivíduo CF189	45
Figura 12. Gráficos gerados pelos programa Genemarker e Coffalyser da análise do MLPA. Indivíduo CF195	46
Figura 13. Gráficos gerados pelos programa Genemarker e Coffalyser da análise do MLPA. Indivíduo CF197	47
Figura 14. Imagem dos indivíduos analisados com a microduplicação no exon 4 do gene GRHL3	48

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Descrição dos genes candidatos a ocorrência de fissuras	28
Tabela 2. Variantes observadas para o gene IRF6	31
Tabela 3. Variantes para o gene <i>GRHL3</i>	33
Tabela 4. Frequência da ocorrência de fissuras em diferentes etnias	35
Tabela 5. Sondas do kit SALSA MLPA probemix P304-B1 IRF6-GRHL3 (Lot B1-0116).....	41
Tabela 6. Distribuição dos indivíduos portadores de fissuras de lábio e/ou palato e não sindrômicas	35

RESUMO

Fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) são defeitos de nascimento facilmente reconhecíveis e amplamente incidentes na população humana. As fissuras têm uma etiologia complexa, envolvendo fatores genéticos e ambientais. São encontradas em aproximadamente 1 em 700 nascimentos e têm substancial impacto na vida das pessoas. As fissuras, de modo geral, acontecem com maior frequência nos homens do que nas mulheres, numa taxa de 2:1. Requerem, sempre, intervenções cirúrgicas, dentárias, fonoaudiológicas, psicológicas e cosméticas. Aproximadamente 2/3 dos casos não estão associadas a qualquer outra anomalia e são chamadas não-sindrômicas (FL/PNS). A etiologia da FL/PNS permanece desconhecida. Estudos preliminares sugerem a participação de uma variedade de genes e/ou *loci*, bem como fatores ambientais na etiologia desses defeitos congênitos. O gene *IRF6* (interferon regulador factor 6) é consistente na sua contribuição como causa das fissuras orais dentre um grande número de genes candidatos. Mutações nesse gene causam uma forma dominante da síndrome de van der Woude, a qual inclui FL/P, e marcadores polimórficos nesse gene estão fortemente associados a FL/P. Recentemente, o gene *GRHL3* foi identificado como um outro gene associado à causa da síndrome de van der Woude. Dessa forma, passou a ser um novo gene candidato as FL/PNS. No presente trabalho, coletamos dados epidemiológicos, ambientais e amostra biológica (sangue periférico) de 80 casos de FL/PNS atendidos na Associação de Combate às Deformidades Faciais (REFACE) da cidade de Goiânia, GO. Investigamos variações nos genes *IRF6* e *GRHL3*, mediante a técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Os resultados mostraram uma duplicação no exon 4 do gene *GRHL3* em quatro indivíduos portadores de fissura de lábio e palato não aparentados. Nenhuma variação foi detectada no gene *IRF6*. Esse é o primeiro relato de uma microduplicação no gene *GRHL3* em indivíduos com FL/PNS. Esses resultados são preliminares e enfatizam a necessidade de aplicação de outros métodos que comprovem esse achado, além de uma maior amostragem e de investigações adicionais no estudo da etiologia das fissuras orais não-sindrômicas.

Palavras-Chave: fissura de lábio e/ou palato, polimorfismo, *GRHL3*, *IRF6*, malformação, MLPA.

ABSTRACT

Cleft lip and / or palate are birth defects easily recognizable and widely incidents in the human population. The clefts have a complex etiology involving genetic and environmental factors. They are found in approximately 1 in 700 births and have substantial impact on people's lives. Require always, surgery, dental, speech therapy, psychological and cosmetic. Clefts are recognized as a result of a wide rate of developmental disorders. Approximately 2/3 of the cases are not associated with any other abnormality and are called "non syndromic." The etiology of non syndromic oral clefts remains unknown. Preliminary studies suggest the involvement of a variety of genes and / or loci and environmental factors seem to play an important role in the genesis of such cases. Advances in molecular and quantitative analysis provide new opportunities to identify genes and gene-environment interactions relevant to the etiology of this common defect and representative birth. In this study, we analyzed a set of 80 cases of cleft lip and / or palate of non syndromic cases of patients of Associação de Combate as Deformidades Faciais (REFACE), collecting epidemiological and clinical data and biological sample for DNA extraction. The analysis was performed by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of *IRF6* and *GRHL3* genes. This study finds only one individual with a duplication of a genomic region of the gene *GRHL3*, emphasizing the necessity of a larger sample and different geographical regions.

Keywords: cleft lip and palate, polymorphism, *IRF6*, *GRHL3*, malformation, MLPA.

1. INTRODUÇÃO

As anomalias craniofaciais afetam uma proporção significativa da sociedade global. A formação da face é um processo intrincado, suscetível a erros de morfogênese, e isso explica o grande número de anomalias congênitas que ocorrem no complexo craniofacial. A formação da cavidade oral compreende a interação de diversos processos embrionários e, dessa forma, qualquer alteração ou falha pode ocasionar em malformações (NUNES, 2005; MOORE, 2012).

Fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) são as anomalias craniofaciais mais frequentes, correspondendo a 25% de todos os defeitos congênitos (MOREIRA, 2007; RILEY *et al.*, 2007). Ocorrem em aproximadamente 1 a cada 1000 crianças nascidas no mundo, e essa taxa varia consideravelmente de acordo com áreas geográficas e grupos étnicos (DIXON *et al.*, 2011).

Devido a inexistência de um sistema de informação integrado e eficiente, que proporcione maior precisão e confiabilidade nos dados encontrados no Brasil, não existe uma padronização no registro de casos de malformações, como as FL/P. Além disso, dados sobre frequências de FL/P podem variar de acordo com o pesquisador e o país (MONLLEÓ *et al.*, 2015).

Fissura não síndrômica é definida como aquela na qual não há o envolvimento de nenhuma outra anomalia física ou de desenvolvimento, sem exposição a qualquer agente teratogênico conhecido que a possa ter causado. De acordo com esta definição, as FL/Ps também são classificadas em: 1) fissura de lábio e/ou palato não síndrômica, 2) fissura de palato não síndrômica, 3) fissura de lábio e/ou palato síndrômica, 4) fissura de palato síndrômica (SCHUTTE; MURRAY, 1999).

Estima-se que 80% das fissuras orais sejam não síndrômicas e possuam origem multifatorial com o envolvimento de fatores genéticos e ambientais, sendo o fator ambiental fundamental na prevenção (KONDO *et al.*, 2002; DIXON *et al.*, 2011, DO REGO BORGES *et al.*, 2015). A descoberta de genes relacionados a síndromes nas quais as FL/Ps estão presentes no quadro clínico, permite o entendimento da etiologia na forma mais comum que é a não síndrômica (KONDO *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2007; JIA *et al.*, 2009; NEVES, 2009; TANG *et al.*, 2009).

Como o fenótipo das fissuras síndrômicas e não síndrômicas é semelhante acredita-se que genes identificados nas fissuras síndrômicas sejam candidatos

promissores para a ocorrência das fissuras não sindrômicas (WANG *et al.*, 2016). As pesquisas genéticas têm se beneficiado das novas tecnologias para análise do DNA.

O gene *IRF6* (*Interferon Regulatory Factor 6*) apresenta uma relação causal com a Síndrome de van der Woude (SVW), e está associado em 12% das FL/Ps não sindrômicas (ZUCCHERO *et al.*, 2004; PARANAÍBA *et al.*, 2008; NEVES, 2009; KERAMEDDIN *et al.*, 2015). Mutações nesse gene foram relatadas em portadores de fissuras orais não sindrômicas (DESMYTER *et al.*, 2010; RUTLEDGE *et al.*, 2010; VELÁZQUEZ-ARAGON *et al.*, 2016), e é um dos genes com grande possibilidade de desempenhar um papel na etiologia das fissuras isoladas e contribuir para a patogênese (ZUCCHERO *et al.*, 2004; VIEIRA, 2008; MANGOLD *et al.*, 2011).

Recentemente, uma variante etiológica do gene *GRHL3* (*Grainyhead-Like Transcription Factor 3*) foi detectada em indivíduos com fissura de palato não sindrômica, sendo uma das poucas mutações identificadas até o momento para essa patologia (LESLIE *et al.*, 2016). Esse achado contribui para a compreensão da base genética do desenvolvimento craniofacial e pode levar a melhorias na predição do risco de recorrências.

Estudos sobre fissuras orofaciais são valiosos devido a morbidade verificada e também por ser modelo para análise de um defeito congênito complexo. A identificação de genes específicos e fatores ambientais permitem uma consultoria genética adequada, além da possibilidade de estratégias preventivas e melhoramento terapêutico (PARANAÍBA *et al.*, 2013). A fissura de lábio e/ou palato é ideal como modelo para características complexas, com alta frequência na população global.

1.1 Embriologia Craniofacial

O desenvolvimento craniofacial é um processo dinâmico, complexo e controlado geneticamente. Inicia-se com a migração de células da crista neural e a migração do segundo rombômero com o direcionamento anterior, formando o primeiro arco branquial que posteriormente dará origem a face. Ocorre então a proliferação mesodérmica lateral. As estruturas da face se formarão a partir dos cinco processos faciais: um frontonasal, dois maxilares, e dois mandibulares (HIATT; GARTNER, 2011).

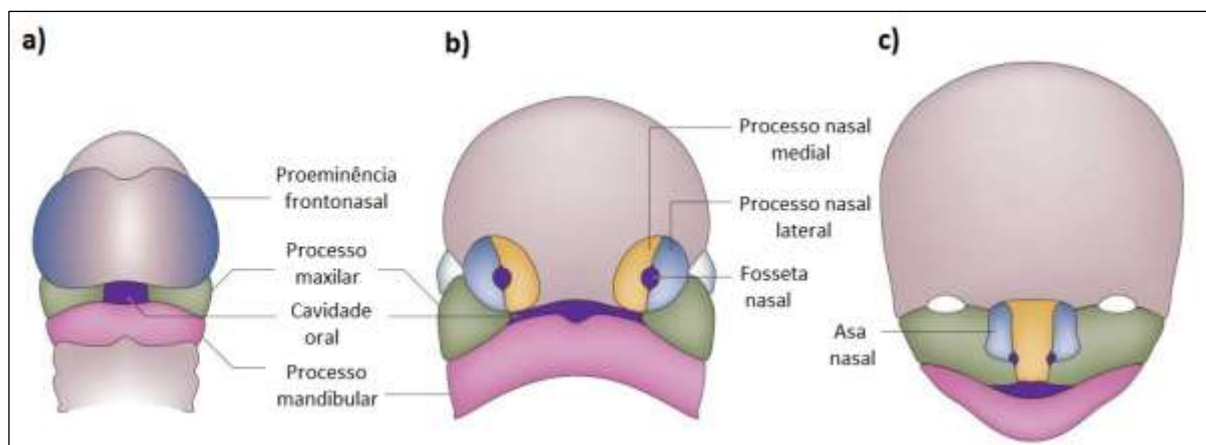
1.1.1 Desenvolvimento da Face

O desenvolvimento embrionário da face inicia-se na 4ª semana de gestação, ao redor do estomodeu – uma cavidade primitiva da boca, formada por uma depressão rasa revestida por ectoderma. Os primórdios da face aparecem como proeminências ao redor do estomodeu: uma proeminência frontonasal, um par de proeminências maxilares e um par de proeminências mandibulares. As proeminências maxilares e mandibulares são derivadas do primeiro par de arcos faríngeos (MOORE, 2012).

As proeminências maxilares formam os limites laterais do estomodeu e, posteriormente, as regiões superiores das bochechas e o lábio superior. As proeminências mandibulares constituem o limite caudal do estomodeu e depois, darão origem ao queixo, ao lábio inferior e as regiões inferiores das bochechas (MOORE, 2012).

No final da 4ª semana aparecem espessamentos bilaterais nas partes inferolaterais da proeminência frontonasal. Depois, esses espessamentos placoides nasais se proliferam produzindo elevações, em forma de ferradura, que darão origem as proeminências nasais mediais e laterais. Entre a 7ª e a 10ª semanas do desenvolvimento embriológico ocorre a fusão das proeminências nasais mediais, formando um segmento intermaxilar, que dará origem a parte central do lábio superior (filtro), a parte pré-maxilar da maxila e gengiva associada, e ao palato primário (HIATT; GARTNER, 2011; MOORE, 2012) (Figura 1).

Figura 1. Desenvolvimento embrionário da face envolvendo o lábio.



a. Desenvolvimento da proeminência frontonasal, pareamento dos processos maxilares e mandibulares, envolvendo a cavidade oral primitiva. **b.** Formação das fossas nasais. **c.** Os processos nasais mediais se fundem aos processos maxilares para formar o lábio superior e palato primário. Modificado de Dixon *et al.*, (2011).

1.1.2 Desenvolvimento do Palato

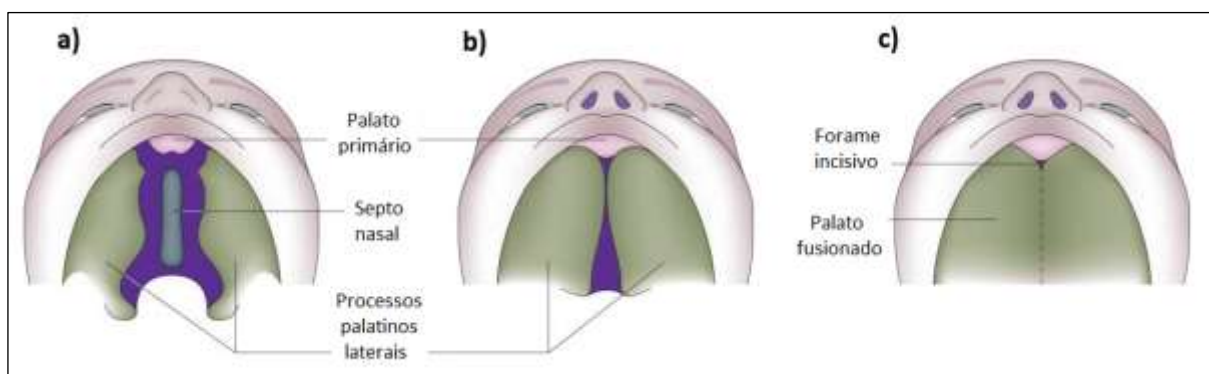
A palatogênese inicia-se na 6ª semana, porém o seu desenvolvimento não está completo até a 12ª semana. Tem como período crítico o final da 6ª semana até o início da 9ª semana. Ocorre em duas etapas: desenvolvimento do palato primário e desenvolvimento do palato secundário (MOORE, 2012).

Para a formação do palato primário o processo mediano (palato primário) começa a se desenvolver no início da 6ª semana, formado pela fusão das proeminências nasais mediais. Esse palato primário representa somente uma pequena parte do palato duro no adulto (HIATT; GARTNER, 2011; MOORE, 2012).

O palato secundário, também chamado de palato definitivo, é o primórdio das partes dura e mole do palato. Começa a se desenvolver a partir de projeções dos feitos internos das proeminências maxilares, são os processos palatinos laterais que se projetam inferomedialmente de cada lado da língua. Com o alongamento da maxila e da mandíbula, a língua assume a posição inferior na boca (MOORE, 2012).

Durante a 7ª e 8ª semanas, os processos palatinos laterais assumem uma posição horizontal superior a língua. O osso se desenvolve gradualmente no palato primário, formando a pré-maxila (que abrigará os dentes incisivos). E, ao mesmo tempo, o tecido ósseo se estende dos ossos palatinos e da maxila para os processos palatinos laterais, resultando na formação do palato duro (Figura 2). As partes posteriores não se tornam ossificadas dando origem ao palato mole e úvula (MOORE, 2012).

Figura 2. Desenvolvimento embrionário da face envolvendo o palato.



a. Palato secundário se desenvolve das projeções dos processos maxilares laterais. **b.** Os processos palatinos laterais assumem posição superior a língua. **c.** Fusão dos processos palatinos. Modificado de Dixon *et al.*, (2011).

Durante esse processo as células das bordas se aderem e formam a linha média epitelial. As células do epitélio da borda medial se intercalam e vão desaparecendo, sendo substituídas por células mesenquimais preenchendo a linha média, formando um palato intacto (MANGOLD *et al.*, 2011). A degeneração da linha média epitelial é importante para a fusão do palato, se as células do epitélio da borda medial não desaparecerem resultará na fenda palatina (HIATT; GARTNER, 2011; MOORE, 2012).

Três mecanismos foram propostos como responsáveis por essa degeneração: migração celular, apoptose e a transição epitelial mesenquimal. Estes mecanismos são regulados pelo fator de crescimento beta 3 (*TGFB3 – Transforming Growth Factor, Beta 3*), durante o desenvolvimento do palato. No entanto, o envolvimento do *IRF6* com a regulação do *TGFB3* durante a fusão do palato ainda não está claro (KE *et al.*, 2013).

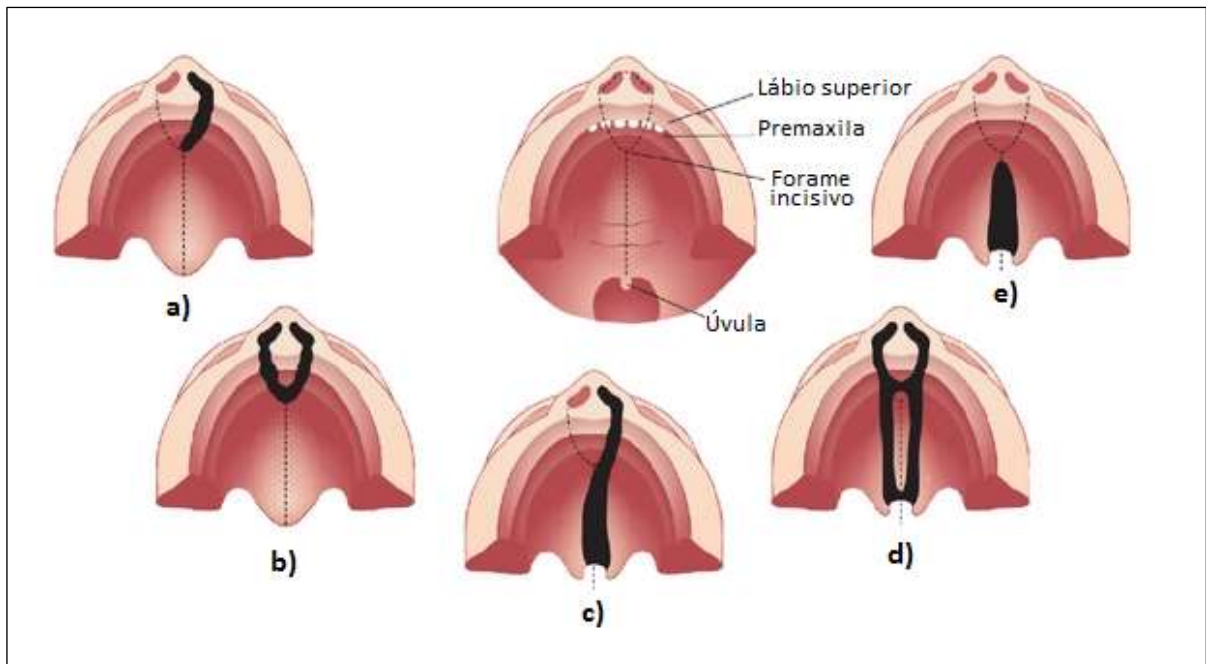
Quando ocorre deficiência ou falha nesses processos de remodelação ou fusão dos processos faciais (no caso do palato), por interrupção da regulação molecular, ocorre a malformação craniofacial (PARANAÍBA *et al.*, 2010). Anormalidades no desenvolvimento embrionário da cabeça e do pescoço resultam em uma grande variedade de malformações. A cabeça e o pescoço se desenvolvem sob controle da herança autossômica e ligada ao sexo e, ainda, sob a modulação da influência significativa de fatores ambientais (HIATT; GARTNER, 2011).

1.2 Características Gerais das Fissuras Orais

As fissuras orofaciais são anomalias craniofaciais comuns. São defeitos classificados de acordo com critérios do desenvolvimento. Existem dois grupos principais: 1) anomalias na fenda anterior: fissuras labiais com ou sem fissura na parte alveolar da maxila; 2) anomalias na fenda posterior: fissuras no palato secundário, por defeitos no desenvolvimento do palato secundário e de crescimento dos processos palatinos laterais, impedindo a fusão (MOORE, 2012).

As FL/Ps podem ser classificadas, segundo Spina *et al.* (1972), baseando-se na posição anatômica do forame incisivo. São divididas em quatro grupos: 1) fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais (FL), 2) fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP), 3) fissuras transforame incisivo ou fissuras lábio-palatinas (FL/P) e 4) as fissuras raras da face (Figura 3).

Figura 3. Desenho esquemático do lábio e palato, representando os tipos mais comuns de fissuras.



a. Fissura labial unilateral com envolvimento alveolar (fissura pré-forame incisivo unilateral). **b.** Fissura labial bilateral com envolvimento alveolar (fissura pré-forame incisivo bilateral). **c.** Fissura labial unilateral associada com fissura palatina completa (fissura transforame). **d.** Fissura labial bilateral com fissura palatina completa (fissura transforame). **e.** Fissura palatina (fissura pós-forame). Modificado de Brito *et al.*, (2012).

A fissura labial unilateral resulta da falha na fusão da proeminência maxilar com as proeminências nasais mediais já fundidas. Fissura labial bilateral resulta da falha na fusão de ambos os lados das proeminências maxilares com as proeminências nasais mediais já fundidas. Nesses casos, o processo palatino mediano fica com a borda livre e se projeta anteriormente (MOORE, 2012).

As fissuras palatinas também podem ser uni e bilaterais e são classificadas em 3 grupos: 1) fissura do palato primário ou anterior: falha na fusão entre processos palatinos laterais e palato primário; 2) fissuras do palato secundário ou posterior: falha na fusão entre os processos palatinos laterais e deles com o septo nasal; 3) fissuras das partes primárias e secundárias do palato: falha na fusão entre os processos palatinos laterais e deles com o palato primário, e ainda com o septo nasal (MOORE, 2012).

1.3 Epidemiologia

Pelo menos 70% dos casos das fissuras são não sindrômicas, ou seja, fissuras isoladas, não associadas a nenhuma síndrome conhecida (LESLIE, MARAZITA, 2013). Esse tipo de fissura ocorre, aproximadamente, em 1,4 a cada 1000 nascimentos no mundo, variando conforme a origem étnica e geográfica dos pais, o gênero do embrião e a condição sócio econômica da família (DIXON *et al.*, 2011).

Os índios nativos americanos têm a maior incidência de FL/P (3,6:1000 nascimentos), seguidos pelos japoneses (2,1:1000); chineses (1,7:1000) e caucasianos (1:1000). Afro-americanos têm a incidência mais baixa (0,3:1000 nascimentos) (CROEN *et al.*, 1998; TOLAROVA; CERENKA, 1998; GRANT *et al.*, 2009; MONLLEÓ *et al.*, 2015).

Diversos estudos indicam que os filipinos e chineses nascidos nos EUA têm uma incidência menor de FL/P do que aqueles nascidos no país de origem (CROEN *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2002). Esses dados sustentam a hipótese de que os indivíduos nascidos em condições sócio econômicas baixas têm risco aumentado para fissuras (CEMBRANO *et al.*, 1995).

Na América do Sul estudos indicam ocorrência de, aproximadamente, 1,1 casos de FL/P não sindrômica para cada 1000 crianças nascidas vivas (VIEIRA *et al.*, 2003; PARANAÍBA, 2010). Os dados do Programa do Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas, um programa que abrange aproximadamente 70 hospitais da América Latina, registraram durante o período de 1982 a 1999 uma prevalência de FL/P de 11,1 em 10.000 nascimentos (*Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas – ECLAMC*, 2002).

No Brasil, estudos epidemiológicos quanto à incidência de FL/P não sindrômicas são escassos e variam consideravelmente. Alguns dados relatam que a incidência varia de 0,19 a 1,54 para cada 1.000 nascimentos (LOFFREDO *et al.*, 2001; NUNES, 2005; MARTELLI-JÚNIOR *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009). Outros relatam a incidência de 1:700 nascimentos (SILVA FILHO; FREITAS, 2007). O Hospital de Clínicas de Porto Alegre, colaborador do ECLAMC verificou uma incidência de FL/P de 3,77 em 10.000 nascimentos (ECLAMC, 2002).

Após mais de 500 anos de miscigenação entre ameríndios, europeus e africanos, observa-se no Brasil uma alta variabilidade de ancestralidade genômica

(PENA *et al.*, 2009; 2011). Contudo, não se sabe se esta diferença epidemiológica é real ou está associada a diferenças metodológicas nas caracterizações fenotípicas.

Em relação ao gênero as FL/P, de modo geral, ocorrem com maior frequência nos homens do que nas mulheres, numa taxa de 2:1 (TOLAROVA, 1987). Entretanto, para a fissura de palato observa-se uma relação de 1 homem para cada 2 mulheres afetadas; e a fissura labial é mais frequente no gênero masculino do que no feminino, numa razão de 2:1 (DIXON *et al.*, 2011).

É mais comum no lado esquerdo do que no lado direito da face, sendo a razão de fissura labial unilateral esquerda, unilateral direita e bilateral de 6:3:1, nos quais 46% dos casos envolvem fissura labial associada à fissura palatina; 33% fissura palatina isolada e 21% fissura labial isolada (GORLIN *et al.*, 2001).

1.4 Fatores Ambientais

Embora as contribuições genéticas para as FL/Ps sejam consideradas maiores do que os fatores ambientais, estes, se identificados, poderiam ser potencialmente manipulados. Além disso, poderiam aumentar o risco de ocorrência para fissuras. Os fatores ambientais são divididos em quatro categorias: ambiente uterino, ambiente externo, nutrição e drogas (HOMRICH, 2006; KOUSA; SCHUTTE, 2016).

Existem diversos teratógenos conhecidos que aumentam o risco para fissuras. Esses incluem drogas antiepiléticas, talidomida, dioxina, ácido retinóico, etilismo e tabagismo (PARANAÍBA *et al.*, 2010). As pesquisas têm focado em como e se esses teratógenos interagem com genes candidatos específicos. Por exemplo, já sabe-se que a dioxina e o ácido retinóico alteram a expressão do gene *TGFB3* (NUGENT; GREENE, 1998; MARAZITA *et al.*, 2009).

Estudos populacionais mostraram que o etilismo materno está relacionado a uma taxa mais alta para fissuras. Hassler e Moran (1986), notaram que a migração e a diferenciação das células da crista neural foram interrompidas em embriões expostos ao álcool. Romitti *et al.* (1999), relataram que a exposição a quatro ou mais doses de álcool por mês elevou, significativamente, o risco para fissuras, especialmente entre aqueles com alterações no gene *MSX1* (*Msh Homeobox 1*).

A identificação de como e por que o tabagismo materno aumenta a incidência de FL/P tem sido de grande interesse. Shi *et al.* (2008), por meio de uma análise retrospectiva de dados, observaram que embriões expostos ao tabagismo materno

durante o primeiro trimestre apresentaram risco aumentado a fissuras. Esse risco também está relacionado ao nível de exposição. O consumo de 20 ou mais cigarros por dia resulta num aumento de duas vezes. Por sua vez, o consumo de menos do que 20 cigarros por dia resulta num aumento de 1,5 vezes. Não se sabe exatamente como o tabagismo afeta diretamente o crescimento fetal, entretanto, os estudos sugerem que a hipóxia alteraria o desenvolvimento facial (CRISTENSEN, 1999; ROMITTI *et al.*, 1999).

1.5 Fatores Genéticos

A genética das anomalias craniofaciais e, em particular, das FL/Ps é de grande complexidade. As etiologias são muitas e complexas envolvendo genes isolados, desordens cromossômicas, interações poligênicas, riscos ambientais e interação gene-ambiente (DIXON *et al.*, 2011; MANGOLD *et al.*, 2011; DO REGO BORGES *et al.*, 2015; LESLIE *et al.*, 2016). Muito se tem aprendido sobre a genética das anomalias craniofaciais. Todavia, sua base genética permanece pouco compreendida apesar da quantidade de estudos.

A identificação de fatores genéticos e ambientais para fissuras tem sido objeto de intensa pesquisa por diversas décadas. Nos últimos anos, com o mapeamento de locos relacionados as fissuras orais, a lista de genes candidatos rapidamente expandiu. O primeiro gene associado à fissura foi o *TGFA* (*Transforming Growth Factor, Alpha*) (ARDINGER *et al.*, 1989; MOSSEY *et al.*, 2009; SOUZA, 2010; MARAZITA, 2012).

Na tabela 1 estão descritos os genes candidatos relacionados a ocorrência das fissuras (DING *et al.*, 2004; LIDRAL; MORENO, 2005; VIEIRA *et al.*, 2005; RILEY; MURRAY, 2007; RILEY *et al.*, 2007; CHIQUET *et al.*, 2008; DIXON *et al.*, 2011; MANGOLD *et al.*, 2011; DO REGO BORGES *et al.*, 2015; LESLIE *et al.*, 2016).

Tabela 1. Descrição dos genes candidatos a ocorrência de fissuras.

GENE	
<i>CRISPLD2</i>	<i>Cysteine-Rich Secretory Protein LCCL Domain Containing 2</i>
<i>FGFR1</i>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
<i>FGFR2</i>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2</i>
<i>FGF8</i>	<i>Fibroblast Growth Factor 8 (Androgen-Induced)</i>
<i>FOXE1</i>	<i>Forkhead Box E1</i>
<i>GABRB3</i>	<i>Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) A Receptor, Beta 3</i>
<i>GLI2</i>	<i>GLI Family Zinc Finger 2</i>
<i>GRHL3</i>	<i>Grainyhead Like Transcription Factor 3</i>
<i>IRF6</i>	<i>Interferon Regulatory Factor 6</i>
<i>JAG2</i>	<i>Jagged 2</i>
<i>LHX8</i>	<i>LIM Homeobox 8</i>
<i>MSX1</i>	<i>Msh Homeobox 1</i>
<i>MSX2</i>	<i>Msh Homeobox 2</i>
<i>MTHFR</i>	<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase (NAD(P)H)</i>
<i>PDGFC</i>	<i>Platelet Derived Growth Factor C</i>
<i>PVRL1</i>	<i>Poliovirus Receptor-Related 1 (Herpesvirus Entry Mediator C)</i>
<i>RARA</i>	<i>Retinoic Acid Receptor, Alpha</i>
<i>SATB2</i>	<i>SATB Homeobox 2</i>
<i>SKI</i>	<i>SKI Proto-Oncogene</i>
<i>SPRY2</i>	<i>Sprouty RTK Signaling Antagonist 2</i>
<i>TGFB3</i>	<i>Transforming Growth Factor, Beta 3</i>
<i>TBX10</i>	<i>T-Box 10</i>
<i>TBX22</i>	<i>T-Box 22</i>

Leslie *et al.* (2016), concluíram que as fissuras orais possuem significativa heterogeneidade genética e identificaram cerca de 15 locos genéticos associados a esta anomalia. Entretanto, esses locos representam pequena parte da variabilidade genética das fissuras, sugerindo que outros fatores de risco genético, provavelmente, estejam envolvidos, tais como os fatores ambientais.

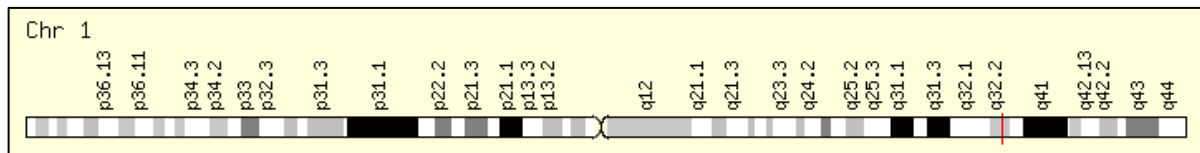
Ao mesmo tempo em que a genética está avançando nesta área, é evidente que ainda restam muitas questões, incluindo a definição do fenótipo e estratégias para a identificação de genes que ainda carecem de respostas. Igualmente importante, esses estudos precisam ser desenvolvidos em conjunto com outros pesquisadores, cujos interesses e habilidades recaiam nas áreas de epidemiologia, meio ambiente,

nutrição, clínica e prevenção. Há esperança de que o melhoramento das técnicas cirúrgicas, fonoaudiológicas, odontológicas, psicológicas, pediátricas e em muitas outras áreas envolvidas com a criança portadora de anomalia craniofacial ocorrerá juntamente com estudos de etiologia e prevenção (SOUSA, 2010; 2015; NAZER; CIFUENTES, 2011).

1.5.1 Gene *IRF6*

O gene *Interferon Regulatory Factor 6 (IRF6)* está localizado no loco 1q32.2, iniciando na base de número 209.785.623 e finaliza na base de número 209.806.175; apresentando um total de 20.553 bases, com orientação *minus strand* (Figuras 4 e 5).

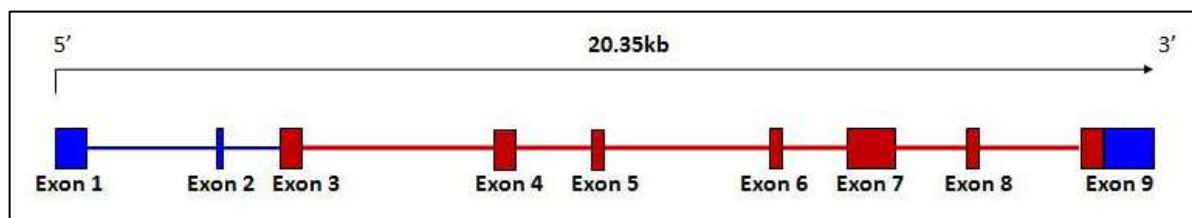
Figura 5. Localização do gene *IRF6* no cromossomo 1, no loco 1q32.2



Fonte: GeneCard (2016).

Esse gene possui 9 exons e transcreve aproximadamente 4306b produzindo uma proteína com 467 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 53.130kDa (Figura 6).

Figura 6. Estrutura dos exons do gene *IRF6*. São 9 exons, sendo que apenas 6 são inteiramente transcritos (em vermelho), um parcialmente transcrito e 2 não transcritos (em azul).



Fonte: GeneCard (2016).

O *IRF6* pertence a uma família de 9 genes de fatores de transcrição. Possui um domínio de ligação ao DNA denominado de *winged-helix* altamente conservado (região aminoterminal) e um domínio de ligação a proteína menos conservado (região

carboxiterminal). A proteína codificada atua como um ativador de ligação da transcrição do DNA. É super expresso na linha do ectoderma das conchas palatais antes e durante a formação do palato secundário (KONDO *et al.*, 2002; BEN *et al.*, 2005; KNIGHT *et al.*, 2006).

Este gene está entre aqueles que apresentam um certo grau convincente de associação à fissuras, consistente entre diversos estudos (JUGESSUR; MURRAY, 2005; JUGESSUR *et al.*, 2008; RAHIMOV *et al.*, 2008; 2012). Sabe-se que mutações nesse gene causam duas doenças alélicas autossômicas dominantes: Síndrome de van der Woude (SVW) e Síndrome Pterígeo Poplíteo (SPP) (KONDO *et al.*, 2002; DE LIMA *et al.*, 2009; JUGESSUR *et al.*, 2009).

A SVW é um dos melhores modelos para FL/P isolada, uma vez que 15% dos indivíduos afetados são clinicamente indistinguíveis das fissuras isoladas. Essa observação rapidamente levantou a hipótese de que variantes genéticas no *IRF6* podem, também, estar envolvidas na etiologia das fissuras isoladas. Essa hipótese foi confirmada em um estudo envolvendo uma amostra composta por 2000 famílias constituídas por 10 populações de diferentes ancestralidades (ZUCCHERO *et al.*, 2004) e, independentemente, replicada em diversos estudos (JUGESSUR *et al.*, 2008). Dessa forma, alguns estudos demonstraram que o gene *IRF6* também contribui para a etiologia das fissuras labiopalatais não sindrômicas (BLANTON *et al.*, 2005; SCAPOLI *et al.*, 2005).

Ratos *irf6* nulos apresentam anomalias na pele, nos membros e defeitos craniofaciais, consistentes com a distribuição fenotípica em SVW e SPP (KONDO *et al.*, 2002). Mutações no domínio de ativação transcricional do *IRF6* foram associadas a inativação da transcrição, a qual pode estar relacionada aos defeitos citados anteriormente (LITTLE *et al.*, 2009; MANGOLD *et al.*, 2011).

Um avanço no entendimento de como o *IRF6* afeta o risco de FL/P isolada foi a identificação de um SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) comum que rompe o sítio de ligação para o fator de transcrição *AP-2α* dentro de uma região de *enhancer* altamente conservada (RAHIMOV *et al.*, 2008; IBARRA-ARCE *et al.*, 2015). O link entre as proteínas IRF6 e AP-2α é, particularmente, devido ao fato de que dados prévios mostraram uma função essencial para AP-2α no fechamento craniano e no desenvolvimento craniofacial (SCHORLE *et al.*, 1996).

Além disso, camundongos portadores de ambas as células tipo selvagem e AP-2α nula, apresentam FL/P e dismorfologia de maxila e mandíbula, consistente com o

desenvolvimento anormal das proeminências faciais (NOTTOLI *et al.*, 1998). Mutações em *TFAP2A* (*Transcription Factor AP-2 Alpha*, que codifica AP-2 α) causa a Síndrome Brânquio-Óculo-Facial, caracterizada por alguns sinais clínicos também observados em SVW (MILUNSKY *et al.*, 2008). O *TFAP2A* está mapeado na região 6p24 onde anomalias cromossômicas foram associadas as fissuras orofaciais (LIDRAL; MORENO, 2005; SHI *et al.*, 2011). Em conjunto, essas informações colocam os genes *IRF6* e *TFAP2A* em uma via de desenvolvimento comum, na qual rompimentos podem contribuir para a patogênese das FL/P.

Vários estudos avaliando SNPs no gene *IRF6* em indivíduos com fissura e seus familiares, em diferentes populações, têm encontrado forte relação entre esses polimorfismos e a FL/P não sindrômica, confirmando associação significativa (KONDO *et al.*, 2002; ZUCCHERO *et al.*, 2004; BLANTON *et al.*, 2005; GHASSIBÉ *et al.*, 2005; SCAPOLI *et al.*, 2005; SRICHOMTHONG *et al.*, 2005; RILEY *et al.*, 2007; SUAZO *et al.*, 2008; JIA *et al.*, 2009; TANG *et al.*, 2009; VELÁZQUEZ-ARAGON *et al.*, 2016).

Extensos estudos com diversas populações testaram o SNP V274I (substituição de uma valina por uma isoleucina no resíduo 274 da proteína IRF6) em 8003 indivíduos, dos quais 6755 eram membros de famílias em que havia pelo menos um indivíduo com fissura. Os autores encontraram uma forte evidência de transmissão do alelo valina causando a fissura de lábio e palato (ZUCCHERO *et al.*, 2004; IBARRA-ARCE *et al.*, 2015). Na Tabela 2 estão descritos as variantes para o gene *IRF6*.

Tabela 2. Variantes observadas para o gene *IRF6*.

SNP	Posição no Cromossomo 1q.32.2	Sequência
rs595918	209.793.498 (+)	ATTTG(A/G)GAAAG
rs599021	209.787.577 (+)	CTAAC(A/C)CCTGA
rs614662	209.789.074 (+)	TAATC(C/T)CAGCA
rs622832	209.800.887 (-)	GAGAG(G/T)TGCTT
rs627212	209.795.838 (+)	AAAAA(A/T)TTTTT

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

rs# – *refSNP cluster*

Fonte: modificado do GeneCard (2016).

O *IRF6* também é um fator determinante na diferenciação e proliferação dos queratinócitos envolvidos na epiderme. O desenvolvimento embrionário de várias

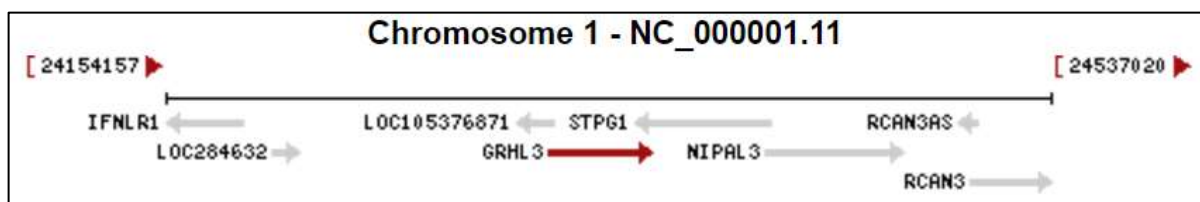
estruturas ectodérmicas (por exemplo: lábios, boca, dígitos, e genitália externa) também depende destes processos serem corretamente regulados (BEN *et al.*, 2005; BLANTON *et al.*, 2005; BOTTI *et al.*, 2011; KWA *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2016).

Embora a via de sinalização principal do *IRF6* não esteja clara, o fato de ser um fator de ativação transcricional de outros fatores de transcrição, como do gene *GRHL3*, é importante para a diferenciação de queratinócitos (HUANG *et al.*, 2009; DESMYTER *et al.*, 2010; BOTTI *et al.*, 2011; DE LA GARZA *et al.*, 2013). Em ratos *irf6 knock-out* ou mutados surge o fenótipo da fissura palatina, indicando a importância do *IRF6* para o desenvolvimento do palato. Embora isso esteja confirmado, outros genes alvo e vias de sinalização que regulam a fusão palatina, ainda não foram claramente determinados (JIA *et al.*, 2009; IBARRA-ARCE *et al.*, 2015; KE *et al.*, 2015; KERAMEDDIN *et al.*, 2015).

1.5.2 Gene *GRHL3*

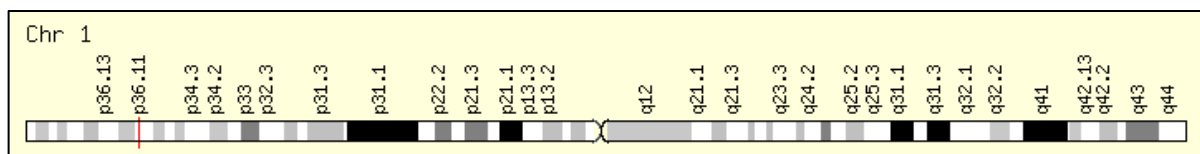
O gene *Grainyhead Like Transcription Factor 3* (*GRHL3*) localizado no loco 1p36.11, inicia-se na base 24.319.322 e finaliza na base 24.364.482, apresentando um total de 45.161 bases, com orientação *plus strand* (Figuras 7 e 8).

Figura 7. Posição de leitura do gene *GRHL3*.



Fonte: NCBI (ID 57822), (2016).

Figura 8. Localização do gene *GRHL3* no cromossomo, no loco 1p36.11



Fonte: GeneCard (2016).

Esse gene possui 19 exons e codifica uma proteína que atua como fator de transcrição, podendo formar dímeros com os genes *GRHL1* ou *GRHL2*. O gene

GRHL1 atua como fator de transcrição durante o desenvolvimento embrionário. O gene *GRHL2* está envolvido na regulação estrutural e na diferenciação dos tecidos epiteliais (WERTH *et al.*, 2010; BOGLEV *et al.*, 2011; SENGU *et al.*, 2012). O *GRHL3* é um fator de transcrição que estimula a migração celular endotelial primária (HE; BIAN, 2016; MANGOLD *et al.*, 2016).

Peyrard-Janvid *et al.* (2014), relataram mutações no gene *GRHL3* em uma família finlandesa, descrita por Koillinen *et al.* (2001), além de sete famílias adicionais com SVW. Esse trabalho evidenciou que o *GRHL3* é o segundo gene cujas mutações levam a SVW. Mutações nos genes *IRF6* e *GRHL3* podem levar a fenótipos quase idênticos da fissura orofacial, confirmando a heterogeneidade de locos para esta síndrome (LESLIE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016). Na Tabela 3 estão descritos as variantes para o gene *GRHL3*.

Tabela 3. Variantes para o gene *GRHL3*.

SNP	Posição no Cromossomo 1p36.11	Sequência
rs481399	24.346.003 (+)	TTGCC(C/T)TGCTT
rs483202	24.327.302 (-)	GAAGA(C/T)AGACC
rs502185	24.330.354 (-)	AATgt(C/T)ctcaa
rs557811	24.328.894 (-)	CCTGG(A/G)TCAAC
rs609352	24.330.705 (-)	ATCAG(A/G)AAAGG

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

rs# – refSNP cluster

Fonte: modificado do GeneCard (2016).

Durante a diferenciação da epiderme, a expressão do gene *GRHL3* na epiderme e epitélio oral é controlada pelo *IRF6*. Consequentemente, a interação desses genes com a fissura deve ser investigada (WANG *et al.*, 2016). Mutações no *GRHL3* alteram o desenvolvimento do epitélio oral. Algumas mutações foram encontradas em familiares de pacientes com SVW, os quais não apresentaram mutações no *IRF6*. No entanto, a associação entre o *GRHL3* e as fissuras não sindrômicas permanece desconhecida (WANG *et al.*, 2016).

1.6 Herança

A tese de Fogh-Andersen (1942) foi o primeiro estudo compreensivo indicando que havia uma causa genética para FL/P. Warkany *et al.* (1943) relataram a presença de componentes ambientais, exposições ou deficiências que poderiam causar FL/P. Como resultado desses estudos a herança das FL/P é explicada como sendo multifatorial onde a condição é causada por genes mais a interação com o ambiente. O embrião herda genes de ambos os pais o que aumenta o risco para FL/P e, em combinação com certos fatores ambientais, o risco vai além do nível limiar e o embrião desenvolve a fissura (WARKANY *et al.* 1943; STANIER; MOORE, 2004).

Diante do exposto, é inevitável que um subgrupo de indivíduos com FL/P o qual tenha sido classificado como não síndrômico, especialmente aquele com história familiar de tipos mistos de fissuras e aquele com herança dominante de fissura, apresente mutações (SIVERTSEN *et al.*, 2008; SULL *et al.*, 2009; WU-CHOW *et al.*, 2013). Sendo assim, é muito importante fazer análises nessas famílias, clínica e geneticamente, para acessar com maior precisão os riscos de recorrência com o propósito final de uma consultoria genética adequada.

Ao se perceber um risco aumentado de recorrência para parentes de primeiro grau de indivíduos afetados e uma grande proporção de indivíduos afetados com histórico familiar positivo, deduziu-se a existência de uma forte base genética para fissuras não síndrômicas (CARINCI *et al.*, 2007). O risco de recorrência de fissuras orofaciais, dentro de uma mesma família, é de 28 a 40 vezes maior se comparada a população geral (EBADIFAR *et al.*, 2015). Estudos em gêmeos mostraram uma maior concordância em gêmeos monozigóticos (40% a 60%) em comparação a gêmeos dizigóticos (3% a 5%), reforçando a importância dos fatores genéticos na etiologia das fissuras não síndrômicas (JUGESSUR *et al.*, 2009; RAHIMOV *et al.*, 2012; CAMPOS NEVES *et al.*, 2016).

Entretanto, o grau de contribuição genética pode ser afetado por etnia, meio ambiente, consanguinidade e origem geográfica. Em países com história recente de imigração e miscigenação, como o Brasil, os fatores étnicos podem ter fortes efeitos nas contribuições genéticas de doenças multifatoriais (BRITO *et al.*, 2011; 2012). A população atual do Brasil é o resultado de séculos de mistura étnica de três grupos principais: europeus, africanos e ameríndios dificultando o estudo em herança complexa (PARRA *et al.*, 2003; PENA *et al.*, 2009; 2011). Na tabela 4, estão descritas

as informações relacionadas em estudos anteriores sobre frequência de fissuras em diferentes etnias.

Tabela 4. Frequência da ocorrência de fissuras em diferentes etnias.

ETNIA	FREQUÊNCIA
Africanos	0,3:1000
Europeus	0,7-1,3:1000
Chineses	1,4:1000
Japoneses	2,1:1000
Ameríndios	3,6:1000

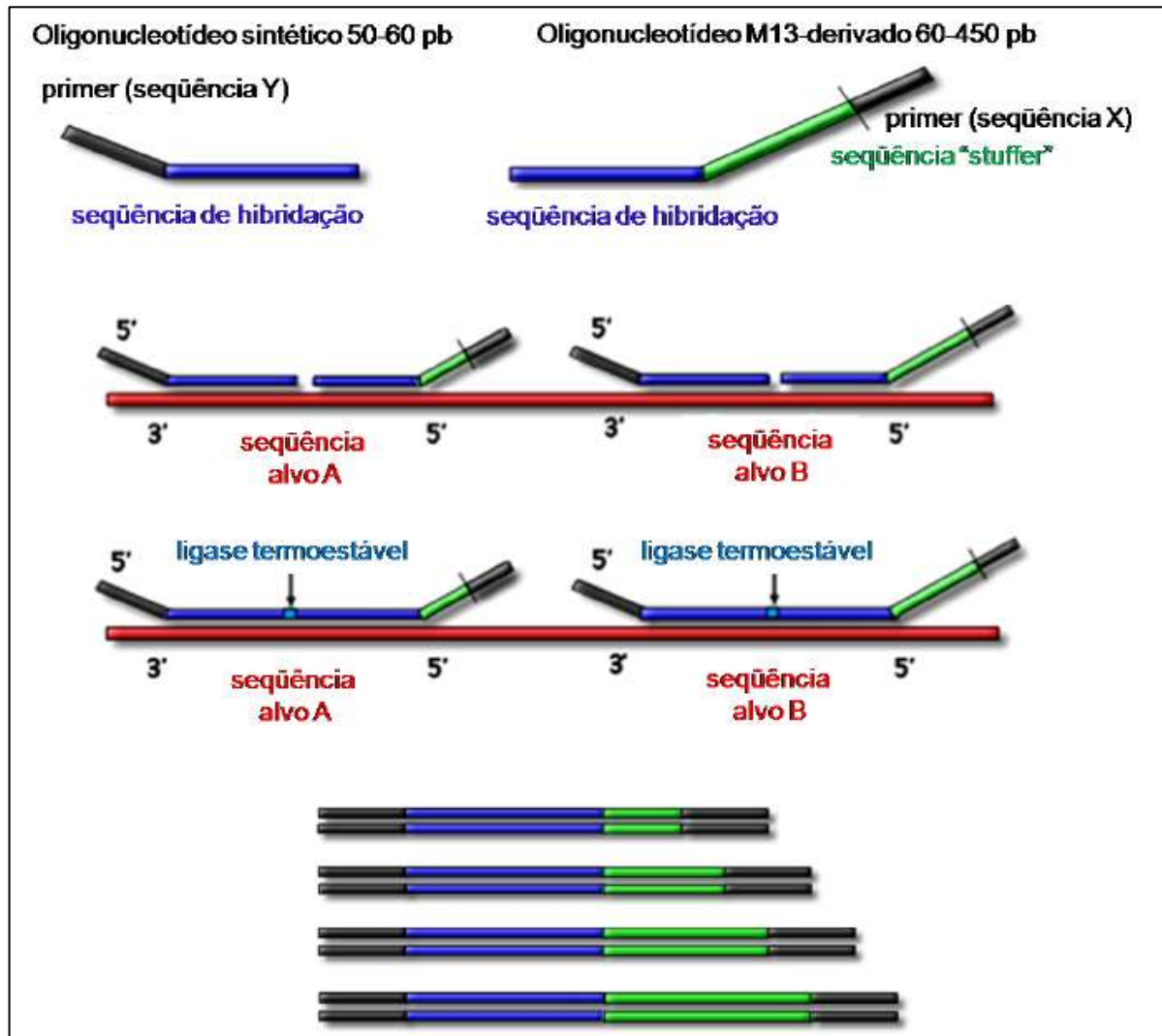
1.7 Técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – MLPA

O presente estudo definiu pela técnica de MLPA, pelo motivo de essa técnica possuir algumas vantagens em relação a outras já utilizadas para a detecção de alterações genômicas relacionadas ao número de cópias, entre as quais se destacam: a detecção de mais de 50 sequências de DNA genômico em uma mesma reação; possibilidade de inclusão de muitas amostras em um mesmo ensaio (reprodutibilidade); capacidade de detectar sequências que diferem em apenas um nucleotídeo; protocolo único para muitas aplicações diferentes; e custo relativamente baixo do ensaio por paciente e a existência de um único kit onde seriam analisados dois genes candidatos a mutações em fissuras não-sindrômicas (SCHOUTEN *et al.*, 2002; WU-CHOW *et al.*, 2013; MRC-Holland®, 2016).

O MLPA, desenvolvido por Schouten *et al.* (2002), é uma técnica de genética molecular rápida, robusta, de excelente relação custo benefício e de alta resolução e especificidade, registrada pela marca comercial MRC-Holland®. É utilizada para detecção de alterações cromossômicas em relação ao número de cópias de DNA em alvos múltiplos. O uso pode auxiliar no diagn[ostico genético de várias síndromes que apresentam micro deleções ou duplicações.

A reação consiste em quatro etapas: 1) desnaturação do DNA; 2) hibridização das sondas; 3) reação de ligação das sondas; e 4) amplificação por PCR (Figura 9). Após essas etapas ocorre a separação dos produtos amplificados através da eletroforese capilar e, posteriormente, a análise dos dados da leitura através de softwares específicos (SCHOUTEN *et al.*, 2002).

Figura 9. Representação esquemática das etapas da reação de MLPA descritas pelo fabricante.



Fonte: modificado de MRC-Holland® (2016).

Na reação são amplificadas sondas que consistem de duas partes (sonda A e B), com cerca de 20 pares de bases (pb) cada. As sondas se ligam em posições adjacentes na sequência alvo e são posteriormente unidas por uma enzima ligase. As sondas possuem na extremidade uma sequência universal (*primer*), marcada com fluorescência e são amplificadas na etapa de PCR (SCHOUTEN *et al.*, 2002).

Em um mesmo experimento são utilizadas várias sondas que se diferenciam por tamanho (em b) e pela presença de uma sequência intercalada entre os *primers*, chamada de *stuffer*. Todas as sondas que se complementam ao DNA se ligarão e, como todas elas são flanqueadas por *primers* de sequências idênticas, a reação de

amplificação ocorrerá simultaneamente, utilizando apenas um par de *primers*. Cada sonda ao ser amplificada corresponderá a um fragmento gênico de tamanho determinado e único (entre 130 e 480 nucleotídeos (nt)) identificados por eletroforese capilar (MRC-Holland®, 2016).

A reação é baseada na análise de alterações relativas ao sinal das sondas. A disponibilidade relativa de sondas ligadas no início da reação de PCR corresponde à disponibilidade das sequências alvo na amostra. Diferenças entre os experimentos podem afetar o padrão dos picos do MLPA, daí a necessidade de incluir sondas de referência em cada experimento (MRC-Holland®, 2016).

2. OBJETIVO

Analisar os genes *IRF6* e *GRHL3*, por MLPA, em portadores de fissuras de lábio e/ou palato não sindrômicas, com a finalidade de se verificar a presença de variações no número de cópias nesses genes.

3. METODOLOGIA

3.1 Casuística

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CEP-UFG – Anexo 1) sob o número de protocolo 1.190.671. Os participantes do estudo foram informados sobre o teor da pesquisa e, após ler o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 2) ou o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE – Anexo 3), os que aceitaram participar do estudo assinaram a autorização do uso dos dados, imagem e amostra biológica.

Os indivíduos com fissura de lábio e/ou palato foram atendidos pela Associação de Combate às Deformidades Faciais (REFACE), com sede em Goiânia, GO, a qual recebe pacientes dos estados de Goiás e do Pará. Fizeram parte deste estudo um total de 80 indivíduos, avaliados clinicamente pelo Dr. Fernando Henrique Cardoso Almas, cirurgião dentista da REFACE, os quais foram classificados como portadores de fissuras orais não sindrômicas. Dentre os 80 indivíduos 44 foram do gênero masculino e 36 do gênero feminino. Quanto a classificação das fissuras 45 apresentam fissura transforame, 32 fissura pré-forame e 3 fissura pós-forame.

As amostras de pacientes do Estado do Pará foram coletadas em unidades de atendimento em suas respectivas cidades, Marabá e Cametá, pelo nosso grupo pessoalmente, assim como as fichas clínicas e respectivas fotos.

Uma amostra de sangue periférico foi coletada de cada indivíduo participante e de seus familiares, quando disponíveis. Quando houve casos de recorrência na família outros membros também foram convidados a participar do estudo. O sangue foi coletado por venopunção (BD® Vacutainer, K2 EDTA 7,2mg) para análises moleculares. Dados clínicos sobre o período da gestação e histórico familiar foram obtidos em um questionário conforme o anexo 4.

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada com 2mL de sangue total de acordo com as recomendações do fabricante do kit comercial *FlexiGene Genomic Purification Kit* (Qiagen®). Esse volume de sangue foi colocado em um tubo Falcon de 15mL. Foram adicionados 5mL de *buffer* FG1 e os tubos foram homogeneizados por

inversão. Foram centrifugados a 3000G por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, com o cuidado de não soltar o *pellet* do fundo do tubo. Foi adicionado 1mL do *buffer* FG2 + proteinase K (preparado previamente) e os tubos foram agitados em vortex para desfazer o *pellet*. Em seguida, os tubos foram incubados em banho maria a 65°C por 10min. Após esse procedimento, foi adicionado 1mL de isopropanol (P.A.) gelado e os tubos foram homogeneizados por inversão. Os tubos foram centrifugados a 3000G por 3min. Descartou-se o sobrenadante por inversão dos tubos. Foi adicionado 1mL de etanol 70% gelado aos tubos que foram agitados no vortex e então centrifugados a 3000G por 3min. Descartou-se o sobrenadante e os tubos foram mantidos abertos, em temperatura ambiente por 24 horas, para evaporação total do etanol utilizado. Após esse período, foi adicionado 200µL do *buffer* FG3. Os tubos foram agitados em vortex e incubados a 65°C por 1 hora para hidratar o DNA. O volume obtido foi transferido para microtubos identificados e armazenados a -20°C até o momento de utilização. O DNA obtido foi avaliado quanto a sua concentração (em ng/µL) e pureza (razão A260/A280) por absorbância da luz UV em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*®).

3.3 Análise por MLPA

A análise de rearranjos pela técnica de MLPA foi realizada utilizando-se o kit *SALSA MLPA probemix P304-B1 IRF6-GRHL3* (Lot B1-0116), seguindo as instruções do fabricante (*MRC-Holland*®), segundo o protocolo original. O kit contém 32 sondas com produtos de amplificação entre 127 e 382 nucleotídeos. Além disso, contém 9 fragmentos controle gerando um produto de amplificação menor do que 120 nucleotídeos, sendo: 4 fragmentos que verificam se a quantidade do DNA genômico foi suficiente para a reação (*Q-fragments*) nas posições 64-70-76-82nt, 3 controles que analisam se a desnaturação do DNA foi completa ou não (*D-fragments*) nas posições 88-92-96nt, um fragmento que marca o cromossomo X no tamanho de 100nt e um fragmento que marca o cromossomo Y no tamanho de 105nt (*MRC-Holland*®).

A primeira etapa da técnica de MLPA foi realizada em microtubos de 0,2µL aos quais foram adicionados 100ng de DNA genômico (amostras previamente quantificadas) perfazendo um volume final de 5µL. As amostras foram desnaturadas no termociclador (*Proflex Thermal Cycler – Life Technologies*®, EUA) a 98°C por 5 minutos e mantidas a 25°C. A cada amostra foram adicionados 1,5µL de *Salsa*

probemix que contém as sondas A e B para cada região analisada; e 1,5µL de *MLPA buffer*, misturando bem todos os reagentes com o auxílio da pipeta. Os microtubos foram novamente desnaturados a 95°C por 1 minuto, seguido da hibridização das sondas que aconteceu a 60°C por 18 horas.

A segunda etapa, após as 18h, ocorreu ainda no termociclador. A temperatura foi reduzida para 54°C e adicionou-se, a cada amostra, 32µL do mix contendo: 3µL de ligase *buffer* A, 3µL de ligase *buffer* B, 1µL de Ligase-65, 25µL de H₂O d.d. (*Millipore Corporation*®). Os microtubos foram mantidos a 54°C por 15 minutos para a ligação das sondas A e B hibridizadas ao DNA correspondente a cada região, e a 98°C por 5 minutos seguido de resfriamento a 15°C.

Para a reação de PCR, utilizou-se o mix contendo: 7,5µL de H₂O d.d. (*Millipore Corporation*®), 2µL de *Salsa PCR primers*, 0,5µL de *Salsa polymerase*. Adicionou-se 10µL desse mix a cada amostra misturando bem todos os reagentes com o auxílio da pipeta. A reação de PCR ocorreu com 35 ciclos sendo: 95°C por 30 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto; 72°C por 20 minutos; e resfriamento a 15°C.

Para a preparação da placa de leitura em eletroforese capilar foi preparado o mix contendo: 0,3µL ROX500 (*Life Technologies*®) e 9µL formamida HiDi (*Life Technologies*®). A placa foi preparada com 9,3µL do mix e adicionou-se 0,7µL do produto de PCR a cada poço previamente identificados no mapa de amostras. A corrida para a separação dos fragmentos foi realizada no sequenciador automático ABI 3500 (*Life Technologies*®) do Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio – ICB1). As amostras foram injetadas nos capilares a 1.6kV por 15 segundos e a corrida foi realizada a 15kV por 30 minutos, a 60°C em polímero POP7 (*Life Technologies*®). As regiões contempladas pelo kit utilizado no presente estudo estão apresentadas na tabela 5. Nem todos os exons dos genes analisados possuem sondas específicas no MLPA.

Tabela 5. Sondas do kit SALSA MLPA probemix P304-B1 IRF6-GRHL3 (Lot B1-0116).

SALSA MLPA P304-B1 IRF6-GRHL3 probemix			
Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	
		reference	IRF6 GRHL3
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
127	Reference probe 18709-L26552	5q31	
133	GRHL3 probe 20334-L27716		Exon 1
142	IRF6 probe 20335-L28463		Exon 3
148 ✕	GRHL3 probe 20336-SP0955-L27718		Exon 10
154	GRHL3 probe 20337-L27719		Exon 16
160	Reference probe 10686-L11268	6p12	
174	GRHL3 probe 20339-L28489		Exon 8
183	GRHL3 probe 20340-L27722		Exon 15
190	Reference probe 08838-L08898	2p13	
196	IRF6 probe 20341-L27723		Exon 4
202	GRHL3 probe 20342-L27724		Exon 2
209	IRF6 probe 20343-L27725		Exon 1
214	IRF6 probe 20344-L27726		Exon 8
226	GRHL3 probe 20345-L27727		Exon 11
237	IRF6 probe 20346-L29166		Exon 6
247	Reference probe 08189-L08083	11q12	
254	IRF6 probe 20348-L27730		Exon 7
260	Reference probe 07723-L07433	7p13	
266 ✕	IRF6 probe 20349-SP0956-L28774		Exon 2
274	GRHL3 probe 20350-L28498		Exon 13
283	Reference probe 15113-L16884	8p23	
288	Reference probe 17604-L21601	18q11	
297	GRHL3 probe 20351-L28500		Exon 4
303	GRHL3 probe 20352-L28501		Exon 12
310	GRHL3 probe 20353-L28776		Exon 9
330	GRHL3 probe 20354-L27736		Exon 14
337	IRF6 probe 20355-L27737		Exon 5
346	GRHL3 probe 20356-L27738		Exon 3
355	IRF6 probe 20887-L28499		Exon 9
364	GRHL3 probe 20358-L27740		Exon 6
372	Reference probe 14422-L16127	12q21	
382	Reference probe 11937-L12757	16p13	

✕ This probe consists of three parts and has two ligation sites.

3.4 Análise dos Dados Obtidos

Os resultados, em formato fasta (.fsa) foram importados para o software Genemarker (SoftGenetics®) e Coffalyser (MRC Holland®). Quantidades relativas dos produtos de sondas amplificadas foram comparadas com as amostras de referência para determinar o número de cópias das sequências-alvo. Esses programas determinam a relação da área dos picos de interesse com a área dos picos das regiões controle, considerando um pico como sendo normal quando a razão entre essas áreas

estiver entre 0,7 e 1,3. Valores inferiores a um limiar de 0,7 e acima de 1,3 indicam a presença de uma deleção ou duplicação, respectivamente (SCHOUTEN *et al.*, 2002).

Foram utilizados 10 pacientes controle, pacientes esses que não possuem nenhum relato de parentesco com nenhum indivíduo portador de fissuras labiais nem palatinas.

4. RESULTADOS

Foram coletados dados clínicos e sangue periférico de 80 indivíduos com fissuras de lábio e/ou palato não sindrômicas, conforme as características descritas na tabela 6. Maiores detalhes da caracterização da amostra estão disponíveis no Anexo 5.

Tabela 6. Distribuição dos indivíduos portadores de fissuras de lábio e/ou palato e não sindrômicas

ESTADO	GOIÁS	PARÁ	TOTAL
	n (%)	n (%)	n (%)
GÊNERO			
Masculino	24 (60)	20 (50)	44 (55)
Feminino	16 (40)	20 (50)	36 (45)
CLASSIFICAÇÃO			
Pré-Forame	14 (35)	18 (45)	32 (40)
Pós-Forame	2 (5)	1 (2,5)	3 (3,8)
Transforame	24 (60)	21 (52,5)	45 (56,2)
FAMILIARES AFETADOS			
Sim	5 (12,5)	16 (40)	21 (26,3)
Não	35 (87,5)	24 (60)	59 (73,7)

O resultado da análise por MLPA nas 80 amostras de FL/P não sindrômicas mostrou uma duplicação no exon 4 do gene *GRHL3*, evidenciada pelo software GeneMarker e pelo software Coffalyser (Figuras 10 a 13). Essa duplicação foi detectada em quatro indivíduos não aparentados, com fissura de lábio e palato, provenientes do estado do Pará (Figura 14).

Figura 10. Gráficos gerados pelos programas *Genemarker* e *Coffalyser* da análise do MLPA. Indivíduo CF185.

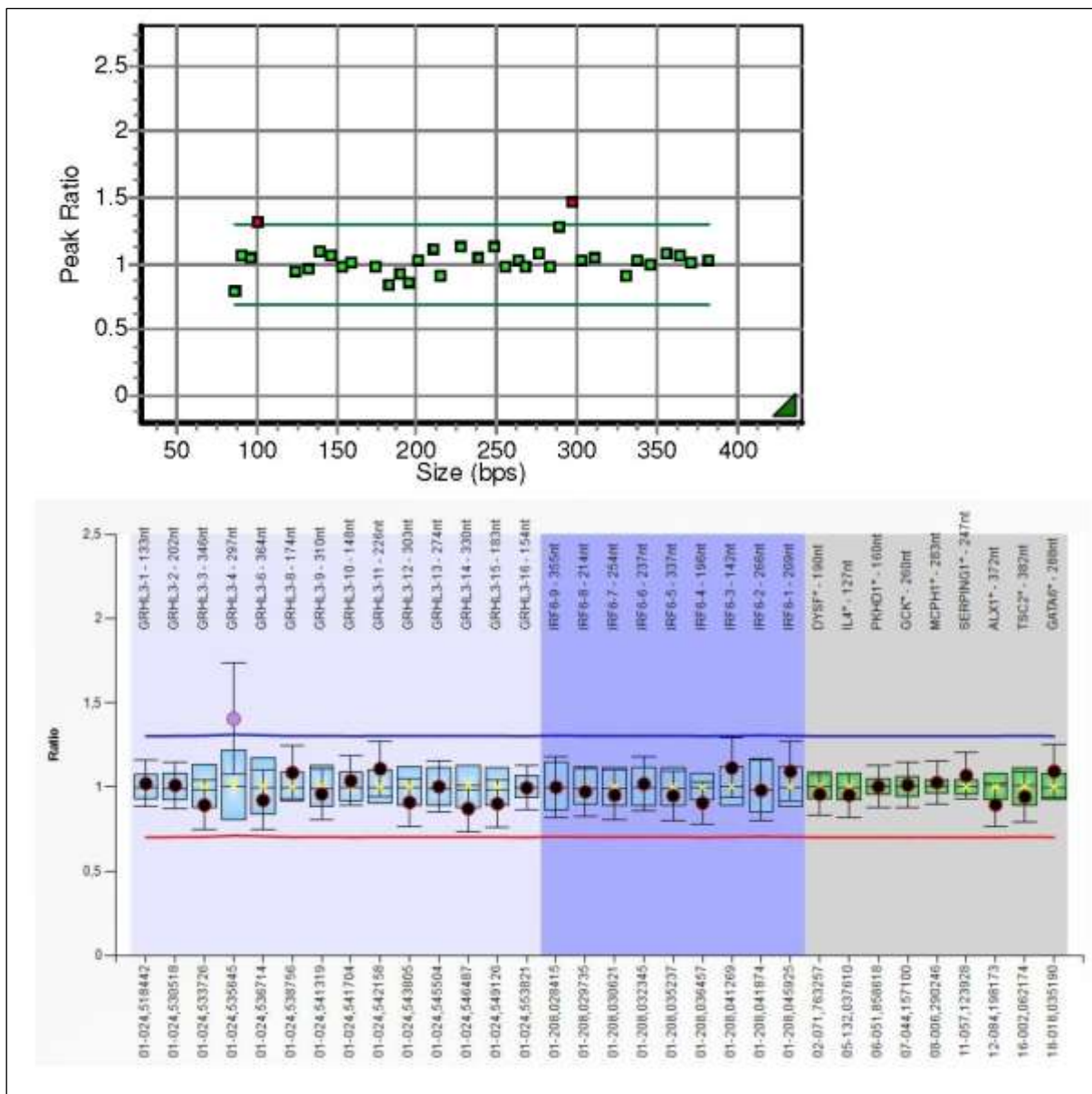


Figura 11. Gráficos gerados pelos programas *Genemarker* e *Coffalyser* da análise do MLPA. Indivíduo CF189.

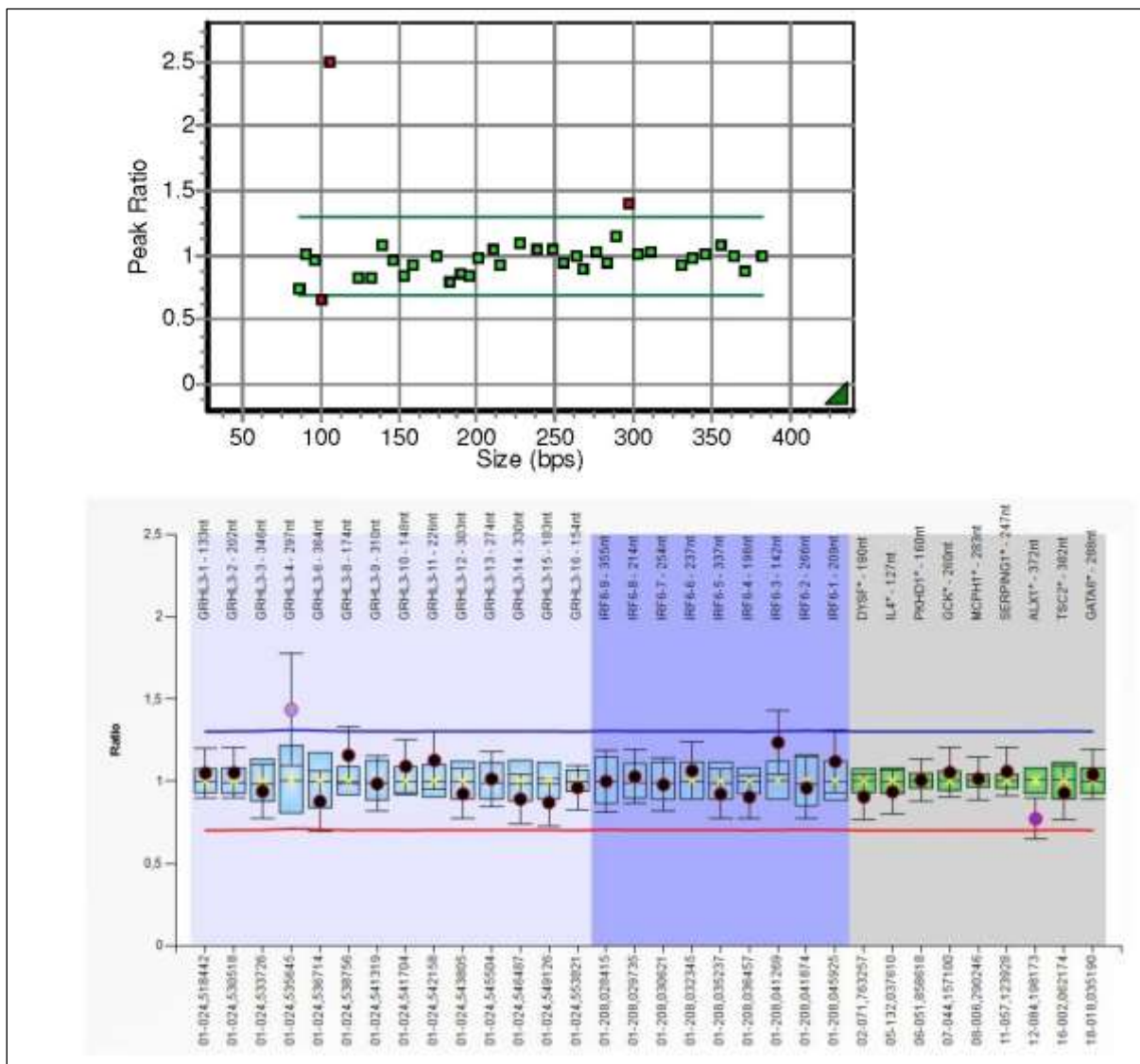


Figura 12. Gráficos gerados pelos programas *Genemarker* e *Coffalyser* da análise do MLPA. Indivíduo CF195.

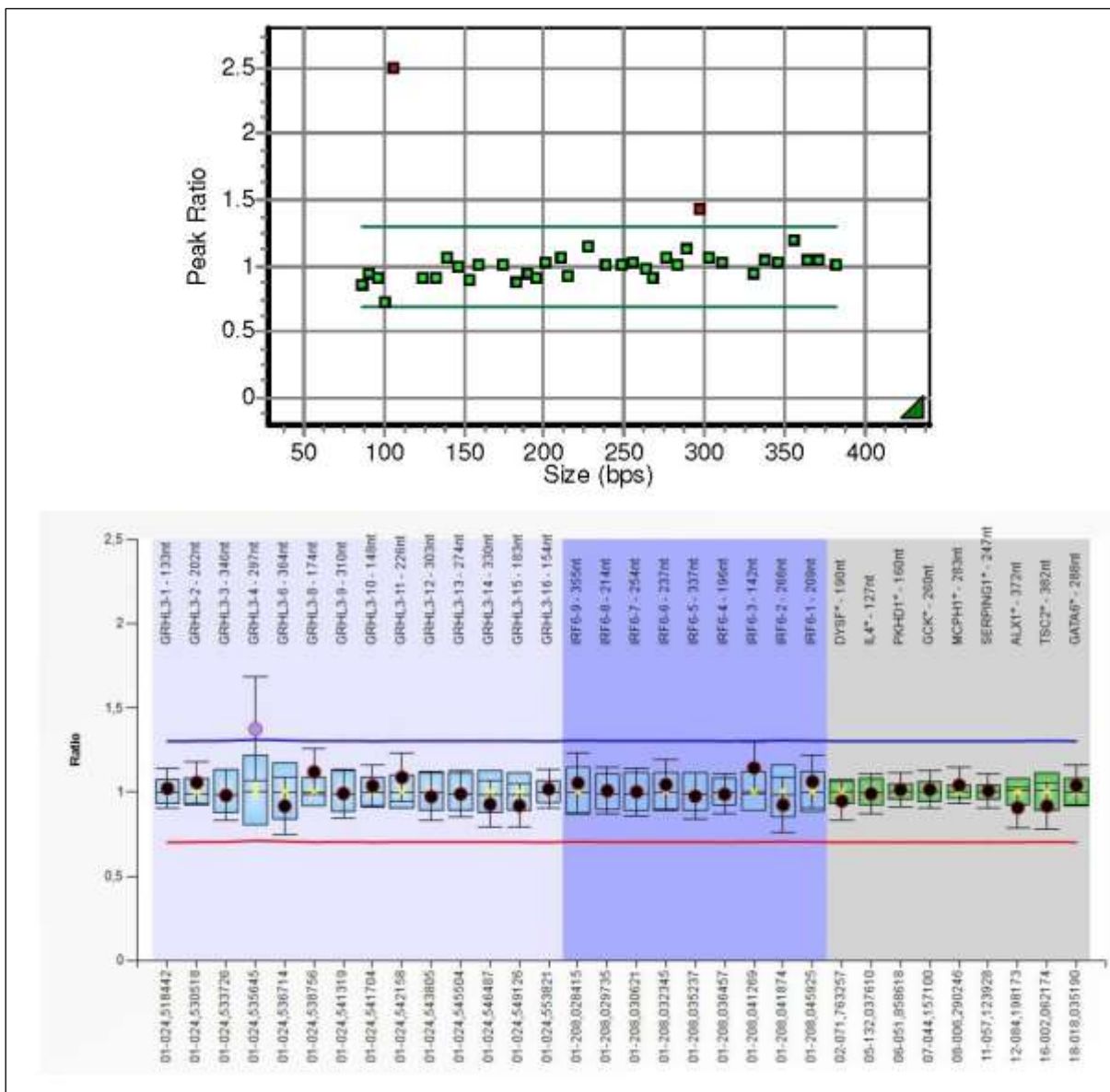


Figura 13. Gráficos gerados pelos programas *Genemarker* e *Coffalyser* da análise do MLPA. Indivíduo CF197.

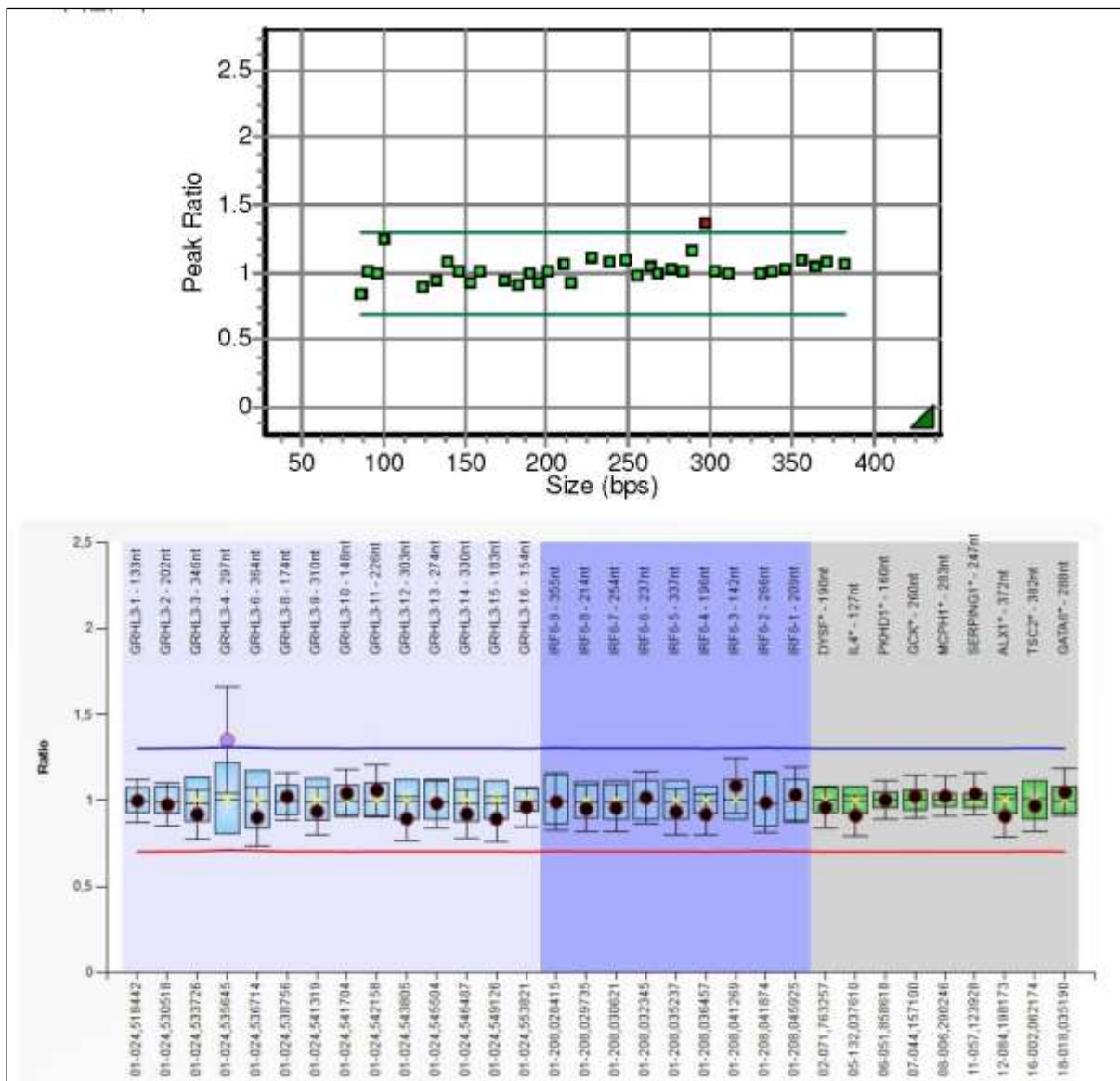


Figura 14. Imagem dos indivíduos analisados com a microduplicação no exon 4 do gene *GRHL3*.



Indivíduos 1 a 3 já foram submetidos a correção cirúrgica. O indivíduo 4 foi submetido posteriormente a correção cirúrgica.

5. DISCUSSÃO

A etiologia das fissuras de lábio e/ou palato não sindrômicas é multifatorial e complexa, e depende da interação entre fatores ambientais e genéticos. A compreensão a respeito da ação dos fatores genéticos associados a essa malformação craniofacial, ainda, permanece incerta (KONDO *et al.*, 2002; VIEIRA, 2006, 2008; VIEIRA *et al.*, 2005, 2007; MILLS *et al.*, 2008). O risco de recorrência é calculado de forma empírica, baseado em estudos populacionais, variando de 4% a 10% dependendo do sexo dos propósitos afetados, número de indivíduos afetados na família e a relação de parentesco com o propósito, sendo maior para parentes em 1º grau (3,5%) (KE *et al.*, 2013).

Dados epidemiológicos, em diferentes populações, mostram que a prevalência da fissura de palato é geralmente mais baixa do que a fissura de lábio e fissura de lábio e palato. Apesar das análises realizadas em uma amostra pequena, composta por 80 indivíduos, a caracterização clínica dessa amostra corrobora com esta afirmativa, uma vez que somente 3,8% (3/80) dos indivíduos apresentaram fissura pós-forame. As FL/Ps de um modo geral, são mais frequentes em homens (H) do que mulheres (M), e para a fissura de palato observa-se uma relação de 1H:2M (NISWANDER *et al.*, 1972). No presente estudo, foram avaliados 44 indivíduos do gênero masculino e 36 feminino, também corroborando com a literatura.

No Brasil, as estimativas de FL/P variam de 0,6 a 1,54 para cada 1000 nascimentos. Este valor pode oscilar dependendo do componente étnico e dos fatores sócio econômicos, os quais ainda são pouco conhecidos (LOFFREDO *et al.*, 2001). O grupo investigado foi composto por indivíduos com FL/P não sindrômica provenientes da região centro oeste e norte do Brasil. De posse dos dados étnicos e sócio econômicos, procurou-se estabelecer uma associação positiva entre esses fatores e a ocorrência das FL/Ps. No entanto, acredita-se que a miscigenação seja bastante elevada nesse grupo, embora não tenha sido confirmada a ancestralidade e outros dados concretos sobre essa hipótese. Além disso, fatores sócio econômicos são bastante heterogêneos nessa população estudada. Dessa forma, não foi possível relacionar esses fatores a etiologia das FL/Ps nesse grupo investigado.

Os fatores relacionados com as FL/P não sindrômicas e resultados variam de estudo para estudo. A ocorrência ou não de polimorfismos genéticos está relacionada a ancestralidade (etnia e região geográfica), além dos fatores ambientais, conforme

citou Dixon *et al.* (2011). O presente estudo observou uma maior frequência de recorrências familiares nos indivíduos do Pará, quando comparados a Goiás. No entanto, esses dados foram informais e não foi possível de fato, constatarlos. Tudo isso pode dificultar a busca por marcadores genéticos para as fissuras não sindrômicas, principalmente no Brasil onde há uma alta taxa de miscigenação conforme os trabalhos realizados por Pena *et al.*, (2009; 2011). A população atual do Brasil é resultado de séculos de mistura étnica (PARRA *et al.*, 2003; PENA *et al.*, 2009; 2011).

Mais de 500 síndromes que cursam com FL/P foram descritas na literatura de acordo com a base de dados do OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man Database*). Entre as síndromes gênicas, destaca-se a Síndrome de van der Woude responsável por 2% de todos os casos de FL/P (SCHUTTE; MURRAY, 1999). Kondo *et al.* (2002) demonstraram que mutações no gene *IRF6* são responsáveis pela maioria dos casos da SVW. O gene *IRF6* é fortemente expresso no ectoderma das porções palatinas antes e durante a formação do palato secundário (BEN *et al.*, 2005; KNIGHT *et al.*, 2006) e que mutações no *IRF6* podem levar a disrupção no desenvolvimento orofacial.

Diversas investigações, com diferentes abordagens, têm sido realizadas na tentativa de identificar o loco de suscetibilidades para FL/P não sindrômica. Diversos candidatos surgiram através de estudos de ligação e associação. O primeiro estudo que sugeriu que polimorfismos no gene *IRF6* poderiam estar associados à predisposição de ocorrência da fissura foi realizado por Zuccherro *et al.* (2004). O *IRF6* passou a ser então considerado como um dos genes candidatos devido ao fato de estar, comprovadamente, ligado à Síndrome de van der Woude, a qual apresenta sobreposições fenotípicas com as fissuras não sindrômicas, conforme constataram os estudos de Zuccherro *et al.* (2004); Jugessur *et al.* (2008) e Rahimov *et al.* (2008).

Recentemente Peyrard-Janvid *et al.* (2014) relataram mutações causadoras de fissuras no gene *GRHL3* em uma família finlandesa descrita por Koillinen *et al.* (2001), além de sete outras famílias com SVW. O gene *GRHL3* passou a ser o segundo cujas mutações levam a SVW. Esses dados demonstraram que mutações nesses dois genes, *IRF6* e *GRHL3*, poderiam levar a fenótipos quase idênticos de fissura orofacial, confirmando assim a heterogeneidade de locos para SVW. Devido à similaridade fenotípica entre as FL/Ps sindrômicas e não sindrômicas, acredita-se que os genes causais identificados nas FL/Ps sindrômicas também sejam genes candidatos

promissores às FL/P não síndrômicas (STANIER; MOORE, 2004). A identificação dos genes *IRF6* e *GRHL3* na SVW é um exemplo de indicação de genes candidatos as FL/Ps não síndrômicas. Sendo assim, no presente estudo avaliou-se a possibilidade de haver variações no número de cópias desses genes em indivíduos com FL/P não síndrômica.

As análises por MLPA realizadas no presente estudo utilizaram o kit *SALSA MLPA probemix P304-B1 IRF6-GRHL3* (Lot B1-0116), específico para os genes *IRF6* e *GRHL3*. A versão anterior do kit MLPA (P304-A1 *IRF6* - Lot A1) analisava os 9 exons do gene *IRF6*, e não incluía sondas para o gene *GRHL3*. Uma nova versão do kit (Lot B1), em comparação com a versão anterior (Lot A1), foi adaptada. Todas as sondas *IRF6* foram redesenhadas, e a sonda específica para a mutação mais frequente foi removida. Além disso, sondas cobrindo o gene *GRHL3* foram incluídas. Os resultados observados demonstraram uma alteração no gene *GRHL3* em quatro indivíduos não aparentados, os quais apresentaram duplicação heterozigota da região de exon 4 desse gene. Estudo de associação entre este gene e as fissuras não síndrômicas mostrou um resultado significativo (WANG *et al.*, 2016), no entanto este é o único trabalho, até o momento, sobre o gene *GRHL3* e as FL/Ps não síndrômicas. Este estudo é o primeiro a investigar alterações no número de cópias por meio da técnica de MLPA nesses dois genes. Portanto, o estudo foi pautado na cautela para a interpretação dos resultados, e dessa forma, realizar outros estudos adicionais para validá-los são fundamentais. De posse dessas confirmações será possível ter um melhor posicionamento a respeito desses achados.

Uma variante polimórfica comum no *IRF6* (rs17015215), onde ocorre uma substituição no resíduo 274 do aminoácido (1083G>A, V274I), no domínio de ligação da proteína IRF6, foi identificada em um estudo sobre a mutação no *IRF6* (KONDO *et al.*, 2002). Um estudo familiar realizado em diversas populações mostrou desequilíbrio de ligação altamente significativo para essa variante em fissuras orais não síndrômicas (ZUCCHERO *et al.*, 2004). Diversos estudos tem realizado o *screening* mutacional do gene *IRF6* numa tentativa de que a determinação das mutações conhecidas se tornem rotina na prática clínica ou de que as mutações desconhecidas no gene *IRF6* possam estar associadas ao fenótipo clínico. Outras análises dos genes *IRF6* e *GRHL3* nesses indivíduos está em andamento. Até o momento nenhuma variante patológica foi detectada.

Wu-Chou *et al.* (2013), analisaram 155 indivíduos com fissuras orais em Taiwan, sendo 80 indivíduos não síndrômicos, e utilizaram o kit P304-A1 (Lot A1). Esses autores não encontraram nenhuma deleção ou duplicação no grupo estudado. Este foi o único trabalho encontrado que utilizou o Kit de MLPA, primeira versão. O presente estudo também não identificou nenhuma alteração no gene *IRF6*. Botti *et al.* (2011); De La Garza *et al.* (2013) e Biggs *et al.* (2015), constataram que apesar do gene *IRF6* não possuir ainda uma sinalização clara, ele é um fator de ativação para outros genes fatores de transcrição como, por exemplo, do *GRHL3*, importantes no processo de diferenciação dos queratinócitos (BIGGS *et al.*, 2015; HIXON *et al.*, 2016).

Hixon *et al.* (2016), no estudo recém publicado, demonstraram que a taxa de proliferação dos queratinócitos é maior em pacientes síndrômicos (SVW) do que em indivíduos com FL/P não síndrômica. A epiderme dos indivíduos síndrômicos apresentou o dobro da espessura quando comparada a epiderme dos não síndrômicos, e a expressão gênica do *PCNA* (*Proliferative Nuclear Cell Antigen*) foi duas vezes maior nos indivíduos com a SVW. Outro achado, nesse estudo, foi a constatação de que nenhum dos indivíduos com FL/P não síndrômica possuía mutação no *IRF6*.

Sendo assim, é possível que variações no gene *IRF6* não estejam associadas ao fenótipo das fissuras orais não síndrômicas, apesar desse ser um dos genes mais indicativos para tal patologia. Como o grupo amostral do presente trabalho é relativamente pequeno (80 indivíduos), o fato de não ter encontrado nenhuma variante no gene *IRF6* não permite afirmar que este gene não esteja associado ao fenótipo das FL/Ps não síndrômicas. No entanto, esses resultados somados aos resultados de Wu-Chou *et al.* (2013), permite acreditar que microdeleções e/ou microduplicações no gene *IRF6* não são variações associadas as FL/P não síndrômicas.

Os estudos de Paranaíba *et al.* (2010); Filézio *et al.* (2013) e Aquino *et al.* (2014) apontam que a dificuldade em estabelecer uma compreensão completa sobre a etiologia das fissuras não síndrômicas justifica-se pelo fato de que são geneticamente heterogêneas e, também, pelo fato de que as relações entre os polimorfismos e as fissuras não síndrômicas variam entre diferentes populações. Até o momento, este é o primeiro trabalho que identificou uma microduplicação no gene *GRHL3* em indivíduos com FL/P não síndrômica. Portanto, o papel funcional do gene *GRHL3* na

etiologia e patologia das FL/Ps não sindrômicas, também merece uma melhor caracterização.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo investigou variações no número de cópias dos genes *IRF6* e *GHRL3* em 80 indivíduos com FL/P não síndrômicas, provenientes da região centro oeste e norte do Brasil. Embora considere-se bem estabelecido que a ação de fatores genéticos e ambientais atuam em conjunto na etiologia das fissuras não síndrômicas, não foi possível detectar nenhum fator ambiental específico que pudesse estar associado ao fenótipo desta patologia, uma vez que os mesmos são diversos e heterogêneos.

O tamanho do grupo investigado, de 80 indivíduos, é relativamente pequeno para este tipo de análise. Contudo, novos indivíduos estão sendo convidados a participar de novas etapas. Como trata-se de uma anomalia geneticamente heterogênea, um grupo amostral maior atribuiria melhor fidedignidade aos resultados.

Não foi encontrada nenhuma variação no gene *IRF6*, corroborando com o estudo de Wu-Chou *et al.* (2013) utilizando a mesma técnica. No entanto, esses são os únicos trabalhos até o momento, os quais investigaram variações no número de cópias do gene *IRF6* por meio da MLPA. Para que seja possível afirmar que, de fato, não há micro deleção e/ou duplicação nesse gene em indivíduos com FL/P não síndrômica, estudos adicionais são necessários.

A detecção de uma microduplicação no gene *GHRL3* em quatro indivíduos não aparentados com fissura de lábio e palato é um resultado preliminar, além de ser o primeiro relato deste tipo de variação no referido gene. É necessário validar esse resultado por outra metodologia, o que já está em andamento. Como um dos primeiros estudos entre o gene *GRHL3* e a ocorrência das FL/Ps não síndrômicas, a contribuição desse gene na etiologia deve ser interpretado com cautela baseando-se em evidências existentes. Além disso, para se ter robustez na associação entre o *GRHL3* e as FL/Ps não síndrômicas, os resultados devem ser validados em um número maior de indivíduos, e grupos populacionais diferentes.

7. REFERÊNCIAS

1. Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet.* 1989 Sep;45(3):348-53.
2. Ben J, Jabs EW, Chong SS. 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 Expr Patterns.* 2005 Jun;5(5):629-38.
3. Biggs LC, Goudy SL, Dunnwald M. Palatogenesis and cutaneous repair: a two headed coin. *Dev Dyn.* 2015 Mar; 244(3): 289–310.
4. Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A.* 2005 Sep 1;137A(3):259-62.
5. Boglev Y, Wilanowski T, Caddy J, Parekh V, Auden A, Darido C, Hislop NR, Cangkrama M, Ting SB, Jane SM. The unique and cooperative roles of the Grainy head-like transcription factors in epidermal development reflect unexpected target gene specificity. *Dev Biol.* 2011 Jan 15;349(2):512-22.
6. Botti E, Spallone G, Moretti F, Marinari B, Pinetti V, Galanti S, De Meo PD, De Nicola F, Ganci F, Castrignanò T, Pesole G, Chimenti S, Guerrini L, Fanciulli M, Blandino G, Karin M, Costanzo A. Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 16;108(33):13710-5.
7. Brito LA, Cruz LA, Rocha KM, Barbara LK, Silva CBF, Bueno DF, Agueña M, Bertola DR, Franco D, Costa AM, Alonso N, Otto PA, Passos-Bueno MR. 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.* 2011;155:1581-1587.
8. Brito LA, Paranaíba LM, Bassi CF, Masotti C, Malcher C, Schlesinger D, Rocha KM, Cruz LA, Bárbara LK, Alonso N, Franco D, Bagordakis E, Martelli H Jr, Meyer D, Coletta RD, Passos-Bueno MR. Region 8q24 is a susceptibility locus for nonsyndromic oral clefting in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012 Jun;94(6):464-8.

9. Campos Neves AT, Volpato LE, Espinosa MM, Aranha AM, Borges AH. Environmental factors related to the occurrence of oral clefts in a Brazilian subpopulation. *Niger Med J*. 2016 May-Jun;57(3):167-72.
10. Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007 Oct;71(10):1509-19.
11. Cembrano JRJ, Vera JS, Joaquina JB, Ng EF, Tongson TL, Manalo PD, Fernandez GC, Encarnacion RC. Familial risk of recurrence of clefts of the lip and palate. *Phil J Surg Spec*. 1995;50:37–40.
12. Chiquet BT, Blanton SH, Burt A, Ma D, Stal S, Mulliken JB, Hecht JT. Variation in WNT genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mol Genet*. 2008 Jul 15;17(14):2212-8.
13. Christensen K. The 20th century Danish facial cleft population—epidemiological and genetic-epidemiological studies. *Cleft Palate Craniofac J*. 1999 Mar;36(2):96-104.
14. Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarová MM. Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. *Am J Med Genet*. 1998 Aug 27;79(1):42-7.
15. de Aquino SN, Hoshi R, Bagordakis E, Pucciarelli MG, Messetti AC, Moreira H, Bufalino A, Borges A, Rangel AL, Brito LA, Oliveira Swerts MS, Martelli-Junior H, Line SR, Graner E, Reis SR, Passos-Bueno MR, Coletta RD. MTHFR rs2274976 polymorphism is a risk marker for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2014 Jan;100(1):30-5.
16. de la Garza G, Schleiffarth JR, Dunnwald M, Mankad A, Weirather JL, Bonde G, Butcher S, Mansour TA, Kousa YA, Fukazawa CF, Houston DW, Manak JR, Schutte BC, Wagner DS, Cornell RA. Interferon regulatory factor 6 promotes differentiation of the periderm by activating expression of Grainyhead-like 3. *J Invest Dermatol*. 2013 Jan;133(1):68-77.
17. de Lima RL, Hoper SA, Ghassibe M, Cooper ME, Rorick NK, Kondo S, Katz L, Marazita ML, Compton J, Bale S, Hehr U, Dixon MJ, Daack-Hirsch S, Boute O, Bayet B, Revencu N, Verellen-Dumoulin C, Vikkula M, Richieri-Costa A, Moretti-Ferreira D, Murray JC, Schutte BC. 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*. 2009 Apr;11(4):241-7.
18. de Souza LT, Kowalski TW, Ferrari J, Monlléo IL, Ribeiro EM, de Souza J, Fett-Conte AC, de Araujo TK, Gil-da-Silva-Lopes VL, Ribeiro-Dos-Santos ÂK, dos Santos SE, Félix TM. Study of IRF6 and 8q24 region in non-syndromic oral clefts in the Brazilian population. *Oral Dis*. 2016 Apr;22(3):241-5.
 19. Desmyter L, Ghassibe M, Revencu N, Boute O, Lees M, François G, Verellen-Dumoulin C, Sznajer Y, Moncla A, Benateau H, Claes K, Devriendt K, Mathieu M, Van Maldergem L, Addor MC, Drouin-Garraud V, Mortier G, Bouma M, Dieux-Coeslier A, Genevieve D, Goldenberg A, Gozu A, Makrythanasis P, McEntagart U, Sanchez A, Vilain C, Vermeer S, Connell F, Verheij J, Manouvrier S, Pierquin G, Odent S, Holder-Espinasse M, Vincent-Delorme C, Gillerot Y, Vanwijck R, Bayet B, Vikkula M. 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*. 2010;1(2):67-74.
 20. Ding H, Wu X, Boström H, Kim I, Wong N, Tsoi B, O'Rourke M, Koh GY, Soriano P, Betsholtz C, Hart TC, Marazita ML, Field LL, Tam PP, Nagy A. A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR-alpha signaling. *Nat Genet*. 2004 Oct;36(10):1111-6.
 21. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011 Mar; 12(3): 167–178.
 22. do Rego Borges A, Sá J, Hoshi R, Viena CS, Mariano LC, de Castro Veiga P, Medrado AP, Machado RA, de Aquino SN, Messetti AC, Spritz RA, Coletta RD, Reis SR. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Brazilian population with high African ancestry. *Am J Med Genet A*. 2015 Oct;167A(10):2344-9.
 23. Ebadifar A, Ameli N, Khorramkhorshid HR, Salehi Zeinabadi⁴ M, Kamali K, Khoshbakht T. Incidence Assessment of MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms in Iranian Non-syndromic Cleft Lip and/or Palate Patients. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2015 Spring;9(2):101-4.
 24. ECLAMC – Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênicas. Documento final da 34^a Reunião Anual do Estudo Colaborativo Latino Americano de Malfomações Congênicas (conferência na internet) 14-19 ago. 2002;

- Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. FIOCRUZ; 2002. Disponível em: <<http://www.eclamcnet.net>>. Acesso em: 05 janeiro, 2016.
25. Filézio MR, Bagordakis E, de Aquino SN, Pereira Messetti AC, Martelli-Júnior H, Swerts MS, Graner E, Coletta RD, Paranaíba LM. Polymorphisms in GABRB3 and oral clefting in the Brazilian population. *DNA Cell Biol.* 2013 Mar;32(3):125-9.
 26. Fogh-Andersen P. Munksgaard; Copenhagen: 1942. Inheritance of Harelip and Cleft Palate.
 27. GENE CARD. GRHL3 Gene. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GRHL3&keywords=GRHL3>>. Acesso em: 05 maio, 2016.
 28. GENE CARD. IRF6 Gene. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IRF6&keywords=IRF6>>. Acesso em: 05 maio, 2016.
 29. Ghassibé M, Bayet B, Revencu N, Verellen-Dumoulin C, Gillerot Y, Vanwijck R, Vikkula M. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population. *Eur J Hum Genet.* 2005 Nov;13(11):1239-42.
 30. Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekam RCM. Syndromes of the head and neck. New York: Oxford University Press. 2001.
 31. Grant SF, Wang K, Zhang H, Glaberson W, Annaiah K, Kim CE, Bradfield JP, Glessner JT, Thomas KA, Garriss M, Frackelton EC, Otieno FG, Chiavacci RM, Nah HD, Kirschner RE, Hakonarson H. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr.* 2009 Dec;155(6):909-13.
 32. Hassler JA, Moran DJ. Effects of ethanol on the cytoskeleton of migrating and differentiating neural crest cells: possible role in teratogenesis. *J Craniofac Genet Dev Biol Suppl.* 1986;2:129-36.
 33. He M, Bian Z. Lack of Association between Missense Variants in GRHL3 (rs2486668 and rs545809) and Susceptibility to Non-Syndromic Orofacial Clefts in a Han Chinese Population. *PLoS One.* 2016 Jul 26;11(7):e0159940.
 34. Hiatt JL, Gartner LP. Cap 4. Cavidade oral, palato e faringe. In: Anatomia cabeça & pescoço. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
 35. Hixon K, Rhea L, Standley J, Canady FJ, Canady JW, Dunnwald M. Interferon Regulatory Factor 6 Controls Proliferation of Keratinocytes From Children With Van der Woude Syndrome. *mCleft Palate Craniofac J.* 2016 Apr 26.

36. Homrich LB. Genes de enzimas de biotransformação e fissuras labiopalatinas em humanos: um estudo da interação genético-ambiental. Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.
37. Huang Y, Wu J, Ma J, Beaty TH, Sull JW, Zhu L, Lu D, Wang Y, Meng T, Shi B. Association between IRF6 SNPs and oral clefts in West China. *J Dent Res*. 2009 Aug;88(8):715-8.
38. Ibarra-Arce A, García-Álvarez M, Cortés-González D, Ortiz de Zarate-Alarcón G, Flores-Peña L, Sánchez-Camacho S, Arenas-Díaz S, Romero-Valdovinos M, Olivo-Díaz A. IRF6 polymorphisms in Mexican patients with non-syndromic cleft lip. *Meta Gene*. 2015 Mar 9;4:8-16.
39. Jia ZL, Li Y, Li L, Wu J, Zhu LY, Yang C, Chen CH, Shi B. Association among IRF6 polymorphism, environmental factors, and nonsyndromic orofacial clefts in western china. *DNA Cell Biol*. 2009 May;28(5):249-57.
40. Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis*. 2009 Oct;15(7):437-53.
41. Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev*. 2005 Jun;15(3):270-8.
42. Jugessur A, Rahimov F, Lie RT, Wilcox AJ, Gjessing HK, Nilsen RM, Nguyen TT, Murray JC. 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*. 2008 Jul;32(5):413-24.
43. Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, Christensen K, Boyles AL, Daack-Hirsch S, Trung TN, Bille C, Lidral AC, Murray JC. Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. *PLoS One*. 2009;4(4):e5385.
44. Ke KM, Mackichan F, Sandy JR, Ness AR, Hollingworth W. Parents' perspectives on centralized cleft services for children: the development of a DCE questionnaire. *Oral Dis*. 2013 Mar;19(2):185-92.
45. Kerameddin S, Namipashaki A, Ebrahimi S, Ansari-Pour N. IRF6 Is a Marker of Severity in Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *J Dent Res*. 2015 Sep;94(9 Suppl):226S-32S.

46. Knight AS, Schutte BC, Jiang R, Dixon MJ. Developmental expression analysis of the mouse and chick orthologues of IRF6: the gene mutated in Van der Woude syndrome. *Dev Dyn*. 2006 May;235(5):1441-7.
47. Koillinen H, Wong FK, Rautio J, Ollikainen V, Karsten A, Larson O, Teh BT, Huggare J, Lahermo P, Larsson C, Kere J. Mapping of the second locus for the Van der Woude syndrome to chromosome 1p34. *Eur J Hum Genet*. 2001 Oct;9(10):747-52.
48. Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de Lima RL, Daack-Hirsch S, Sander A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Lammer EJ, Aylsworth AS, Ardinger HH, Lidral AC, Pober BR, Moreno L, Arcos-Burgos M, Valencia C, Houdayer C, Bahuau M, Moretti-Ferreira D, Richieri-Costa A, Dixon MJ, Murray JC. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet*. 2002 Oct;32(2):285-9.
49. Kousa YA, Schutte BC. Toward an orofacial gene regulatory network. *Dev Dyn*. 2016 Mar;245(3):220-32.
50. Kwa MQ, Huynh J, Aw J, Zhang L, Nguyen T, Reynolds EC, Sweet MJ, Hamilton JA, Scholz GM. Receptor-interacting protein kinase 4 and interferon regulatory factor 6 function as a signaling axis to regulate keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2014 Nov 7;289(45):31077-87.
51. Leslie EJ, Liu H, Carlson JC, Shaffer JR, Feingold E, Wehby G, Laurie CA, Jain D, Laurie CC, Doheny KF, McHenry T, Resick J, Sanchez C, Jacobs J, Emanuele B, Vieira AR, Neiswanger K, Standley J, Czeizel AE, Deleyiannis F, Christensen K, Munger RG, Lie RT, Wilcox A, Romitti PA, Field LL, Padilla CD, Cutiongco-de la Paz EM, Lidral AC, Valencia-Ramirez LC, Lopez-Palacio AM, Valencia DR, Arcos-Burgos M, Castilla EE, Mereb JC, Poletta FA, Orioli IM, Carvalho FM, Hecht JT, Blanton SH, Buxó CJ, Butali A, Mossey PA, Adeyemo WL, James O, Braimah RO, Aregbesola BS, Eshete MA, Deribew M, Koruyucu M, Seymen F, Ma L, de Salamanca JE, Weinberg SM, Moreno L, Cornell RA, Murray JC, Marazita ML. A Genome-wide Association Study of Nonsyndromic Cleft Palate Identifies an Etiologic Missense Variant in GRHL3. *Am J Hum Genet*. 2016 Apr 7;98(4):744-54.
52. Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013 Nov;163C(4):246-58.

53. Lidral AC, Moreno LM. Progress toward discerning the genetics of cleft lip. *Curr Opin Pediatr*. 2005 Dec;17(6):731-9.
54. Little HJ, Rorick NK, Su LI, Baldock C, Malhotra S, Jowitt T, Gakhar L, Subramanian R, Schutte BC, Dixon MJ, Shore P. 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*. 2009 Feb 1;18(3):535-45.
55. Loffredo LCM, Freitas JAS, Grigolli AAG. Prevalência de fissuras orais de 1975 a 1994. *Revista de Saúde Pública*. 2001;35(6):571-575.
56. Mangold E, Böhmer AC, Ishorst N, Hoebel AK, Gültepe P, Schuenke H, Klamt J, Hofmann A, Gölz L, Raff R, Tessmann P, Nowak S, Reutter H, Hemprich A, Kreusch T, Kramer FJ, Braumann B, Reich R, Schmidt G, Jäger A, Reiter R, Brosch S, Stavusis J, Ishida M, Seselgyte R, Moore GE, Nöthen MM, Borck G, Aldhorae KA, Lace B, Stanier P, Knapp M, Ludwig KU. Sequencing the GRHL3 Coding Region Reveals Rare Truncating Mutations and a Common Susceptibility Variant for Nonsyndromic Cleft Palate. *Am J Hum Genet*. 2016 Apr 7;98(4):755-62.
57. Mangold E, Ludwig KU, Nöthen MM. Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. *Trends Mol Med*. 2011 Dec;17(12):725-33.
58. Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Govil M, Daack-Hirsch S, Riley B, Jugessur A, Felix T, Morene L, Mansilla MA, Vieira AR, Doheny K, Pugh E, Valencia-Ramirez C, Arcos-Burgos M. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered*. 2009;68(3):151-70.
59. Marazita ML. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012;13:263-83.
60. Martelli-Júnior H, Bonan PR, Santos RC, Barbosa DR, Swerts MS, Coletta RD. An epidemiologic study of lip and palate clefts from a Brazilian reference hospital. *Quintessence Int*. 2008 Oct;39(9):749-52.
61. Mills JL, Molloy AM, Parle-McDermott A, et al. Folate-Related Gene Polymorphisms as Risk Factors for Cleft Lip and Cleft Palate. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2008;82(9):636-643.

62. Milunsky JM, Maher TA, Zhao G, Roberts AE, Stalker HJ, Zori RT, Burch MN, Clemens M, Mulliken JB, Smith R, Lin AE. TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008 May;82(5):1171-7.
63. Monlleó IL, Barros AG, Fontes MI, Andrade AK, Brito GM, Nascimento DL, Gilda-Silva-Lopes VL. Diagnostic implications of associated defects in patients with typical orofacial clefts. *J Pediatr (Rio J).* 2015 Sep-Oct;91(5):485-92.
64. Moore K. *Embriologia Clínica.* 9ª ed. Ed. Elsevier, 2013. 376p.
65. Moreira CC. Estudo do gene IRF6 em uma amostra de pacientes portadores de fissuras labiopalatinas não-sindrômicas por meio da triagem de mutação por sequenciamento automático. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Odontologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 2007.
66. Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet.* 2009 Nov 21;374(9703):1773-85.
67. MRC-HOLLAND. MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. Disponível em: http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_wl2zCji-rCGANQgZPuTixsEyIW1MscfzuKj2NDFYc-g. Acesso: 04 fevereiro, 2016.
68. Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet.* 2002 Apr;61(4):248-56.
69. Nazer HJ, Cifuentes OL. Congenital malformations in Latin America in the period 1995-2008. *Rev Med Chil.* 2011 Jan;139(1):72-8.
70. NCBI (ID 3664), (2016). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3664>. Acesso em: 30 abril, 2016.
71. NCBI (ID 57822), (2016). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57822>. Acesso em: 30 abril, 2016.
72. Neves LT. Triagem de mutação no éxon 3 do gene IRF6 em indivíduos com fissura labiopalatina e agenesia dentária: padronização de protocolo para sequenciamento de DNA genômico a partir de saliva. Tese Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo. 2009.
73. Niswander JD, MacLean CJ, Chung CS, Dronamraju K. Sex ratio and cleft lip with or without cleft palate. *Lancet.* 1972 Oct 21;2(7782):858-60.
74. Nottoli T, Hagopian-Donaldson S, Zhang J, Perkins A, Williams T. AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13714-9.

75. Nugent P, Greene RM. MSX-1 gene expression and regulation in embryonic palatal tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998 Nov-Dec;34(10):831-5.
76. Nunes LMN. Prevalencia de fissuras labiopalatais e sua notificação no sistema de informação. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 2005.
77. Paranaíba LM, Bufalino A, Martelli-Júnior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD. Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis.* 2010 Mar;16(2):193-7.
78. Paranaíba LM, Coletta RD, Swerts MS, Quintino RP, de Barros LM, Martelli-Júnior H. Prevalence of Dental Anomalies in Patients With Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate in a Brazilian Population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2013 Jul;50(4):400-5.
79. Paranaíba LM, Martelli-Júnior H, Oliveira Swerts MS, Line SR, Coletta RD. Novel mutations in the IRF6 gene in Brazilian families with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med.* 2008 Oct;22(4):507-11.
80. Paranaíba LMR. Avaliação de Polimorfismos Gênicos e Frequência de Anomalias Dentais em Pacientes com Fissura Labial e/ou Palatina Não-Sindrômica. Tese Doutorado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas. 2010.
81. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2003;100(1):177-182.
82. Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res.* 2009 Oct;42(10):870-6.
83. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011 Feb 16;6(2):e17063.
84. Peyrard-Janvid M, Leslie EJ, Kousa YA, Smith TL, Dunnwald M, Magnusson M, Lentz BA, Unneberg P, Fransson I, Koillinen HK, Rautio J, Pegelow M, Karsten A, Basel-Vanagaite L, Gordon W, Andersen B, Svensson T, Murray JC, Cornell

- RA, Kere J, Schutte BC. Dominant mutations in GRHL3 cause Van der Woude Syndrome and disrupt oral periderm development. *Am J Hum Genet.* 2014 Jan 2;94(1):23-32.
85. Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 2012 Jan;49(1):73-91.
 86. Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen RP, Pennacchio LA, Schutte BC, Murray JC. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet.* 2008 Nov;40(11):1341-7.
 87. Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, Russo ET, Vieira AR, Dodé C, Mohammadi M, Marazita ML, Murray JC. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Mar 13;104(11):4512-7.
 88. Riley BM, Murray JC. Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases. *Am J Med Genet A.* 2007;143A:3228–3234.
 89. Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res.* 2009 Jan-Mar;23(1):38-42.
 90. Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology.* 1999 Jan;59(1):39-50.
 91. Rutledge KD, Barger C, Grant JH, Robin NH. IRF6 mutations in mixed isolated familial clefting. *Am J Med Genet A.* 2010 Dec;152A(12):3107-9.
 92. Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, Carinci F. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am J Hum Genet.* 2005 Jan;76(1):180-3.
 93. Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ. Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature.* 1996 May 16;381(6579):235-8.

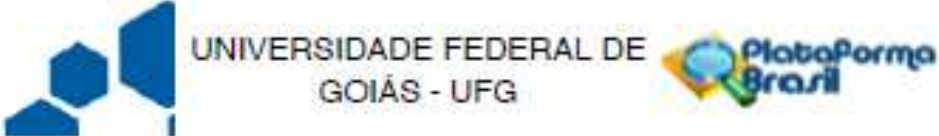
94. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jun 15;30(12):e57.
95. Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet.* 1999;8(10):1853-9.
96. Senga K, Mostov KE, Mitaka T, Miyajima A, Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol Cell.* 2012 Aug;23(15):2845-55.
97. Shi J, Song T, Jiao X, Qin C, Zhou J. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the IRF6 and TFAP2A in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCLP) in a northern Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jul 15;410(4):732-6.
98. Shi M, Wehby GL, Murray JC. Review on genetic variants and maternal smoking in the etiology of oral clefts and other birth defects. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2008 Mar;84(1):16-29.
99. Silva Filho OG, Freitas JAS. Caracterização morfológica e origem embrionária. In: Silva Filho OG, Trindade IEK. *Fissuras labiopalatinas uma abordagem interdisciplinar.* São Paulo: Editora Santos; 2007. p.17-49.
100. Sivertsen A, Wilcox AJ, Skjærven R, Vindenes HA, Åbyholm F, Harville E, Lie RT. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ.* 2008 Feb 23; 336(7641): 432–434.
101. Souza LT. Estudo da associação do polimorfismo TGFA/TAQ I e fatores ambientais nas fissuras orais não sindrômicas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. 2010.
102. Souza LT. Estudo de genes candidatos para fissuras orais não sindrômicas e análise do efeito da suplementação com ácido fólico. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. 2015.
103. Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classificação das fissuras lábio-palatinas. Sugestão de modificação. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo.* 1972;27(1):5-6.

104. Srichomthong C, Siriwan P, Shotelersuk V. Significant association between IRF6 820G->A and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Thai population. *J Med Genet.* 2005 Jul;42(7):e46.
105. Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet.* 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R73-81.
106. Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Linkage disequilibrium between IRF6 variants and nonsyndromic cleft lip/palate in the Chilean population. *Am J Med Genet A.* 2008 Oct 15;146A(20):2706-8.
107. Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, Fallin MD, Ingersoll RG, Park J, Wu-Chou YH, Chen PK, Chong SS, Cheah F, Yeow V, Park BY, Jee SH, Jabs EW, Redett R, Scott AF, Beaty TH. Maternal transmission effects of the PAX genes among cleft case-parent trios from four populations. *Eur J Hum Genet.* 2009 Jun; 17(6): 831–839.
108. Tang W, Du X, Feng F, Long J, Lin Y, Li P, Liu L, Tian W. Association analysis between the IRF6 G820A polymorphism and nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate in a Chinese population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2009 Jan;46(1):89-92.
109. Tolarová M. Orofacial clefts in Czechoslovakia. Incidence, genetics and prevention of cleft lip and palate over a 19-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1987;21(1):19-25.
110. Tolarová MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet.* 1998 Jan 13;75(2):126-37.
111. Velázquez-Aragón JA, Alcántara-Ortigoza MA, Estandia-Ortega B, Reyna-Fabián ME, Méndez-Adame CD, González-Del Angel A. Gene Interactions Provide Evidence for Signaling Pathways Involved in Cleft Lip/Palate in Humans. *J Dent Res.* 2016 Oct;95(11):1257-64.
112. Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, O'Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, Fitzpatrick DR, Jiang R, Marazita ML, Murray JC. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.* 2005 Dec;1(6):e64.
113. Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Orioli IM, Castilla EE. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America. *Am J Med Genet A.* 2007 Sep 1;143A(17):2075-8.

114. Vieira AR. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2006 May 1;163(9):790-810.
115. Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008 Feb;87(2):119-25.
116. Wang Y, Sun Y, Huang Y, Pan Y, Jia Z, Ma L, Ma L, Lan F, Zhou Y, Shi J, Yang X, Zhang L, Jiang H, Jiang M, Yin A, Cheng J, Wang L, Yang Y, Shi B. Association study between Van der Woude Syndrome causative gene GRHL3 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chinese cohort. *Gene.* 2016 Aug 15;588(1):69-73.
117. Warkany J, Nelson RC, Schraffenberger E. Congenital -malformations induced in rats by maternal nutritional deficiency. *Am J Dis Child.* 1943;65:882-894.
118. Werth M, Walentin K, Aue A, Schönheit J, Wuebken A, Pode-Shakked N, Vilianovitch L, Erdmann B, Dekel B, Bader M, Barasch J, Rosenbauer F, Luft FC, Schmidt-Ott KM. The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development.* 2010 Nov;137(22):3835-45.
119. Wu-Chou YH, Lo LJ, Chen KT, Chang CS, Chen YR. A combined targeted mutation analysis of IRF6 gene would be useful in the first screening of oral facial clefts. *BMC Med Genet.* 2013 Mar 20;14:37.
120. Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J, Natsume N, Yoshiura K, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Moreno L, Arcos-Burgos M, Lidral AC, Field LL, Liu YE, Ray A, Goldstein TH, Schultz RE, Shi M, Johnson MK, Kondo S, Schutte BC, Marazita ML, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med.* 2004 Aug 19;351(8):769-80.

8. ANEXOS

Anexo 1. Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás


PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA EM INDIVÍDUOS COM ANOMALIAS CRANIOFACIAIS UTILIZANDO ESTRATÉGIAS CITOGENÉTICAS E MOLECULARES Pesquisador: Lucilene Arlino Ribeiro Bicudo Área Temática: Genética Humana; (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;); Versão: 2 CAAE: 43929115.8.0000.5083 Instituição Proponente: Universidade Federal de Goiás - UFG Patrocinador Principal: Financiamento Próprio DADOS DO PARECER Número do Parecer: 1.190.671 Apresentação do Projeto: Trata-se de um projeto envolvendo genética humana com propositura do Laboratório de Citogenética e Genética Molecular do ICB, da Universidade Federal de Goiás. Alegam os autores que a presente pesquisa dispensa o parecer ético em nível do CONEP. O projeto envolve o diagnóstico molecular e citogenético em 100 ou 150 indivíduos com anomalias craniofaciais cadastrados em centro especializado nominado de REFACE. Em linhas gerais, visa realizar a confirmação genéticas de informações clínicas objetivando fornecer maiores informações à seus familiares e à equipe médica a respeito da patologia (prognóstico) e esclarecimentos sobre os riscos de recorrência da doença. Objetivo da Pesquisa: Objetivo Primário: Investigação clínica, citogenética e molecular em indivíduos com anomalias craniofaciais. Objetivo Secundário: - Realizar o cariótipo dos indivíduos da casuística em busca de alterações cromossômicas, pela citogenética clássica. - Investigação de microdeleções/duplicações pela técnica de MLPA nos indivíduos com cariótiponormal. - Realizar a técnica de arrayCGH nos indivíduos sem alterações no cariótipo e no MLPA.
Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970 UF: GO Município: GOIÂNIA Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1183 E-mail: cep.prpl.ufg@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 1.190.671

- Realizar o sequenciamento pelo método de Sanger de possíveis genes associados ao provável diagnóstico do paciente.
- Fornecer a consultoria genética aos indivíduos e familiares envolvidos na avaliação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

afirmam os autores que a coleta do sangue periférico não colocará em risco a vida do indivíduo, visto ser um procedimento simples e realizado por profissionais capacitados. Poderá surgir um desconforto causado pela punção da agulha durante o procedimento da coleta, porém, um efeito passageiro. Na região poderá surgir um leve hematoma que desaparecerá em poucos dias. Dados coletados não implicam riscos ao indivíduo e o sigilo será preservado assim como seu consentimento. envolvidos no estudo serão mantidos no anonimato. É garantido o sigilo total e privacidade dos participantes referentes aos dados colhidos. Alegam não haver qualquer tipo de ressarcimento monetário aos participantes em virtude da participação na pesquisa. Todos os resultados dos testes genéticos serão entregues aos participantes.

Benefícios – aos indivíduos analisados: serão beneficiados com os resultados dos exames genéticos e ampliar o acesso aos exames genéticos reforçando a importância da implementação de políticas de saúde na área da genética no SUS. Os responsáveis receberão o aconselhamento genético de acordo com os resultados obtidos. Aos familiares que apresentarem histórico familiar positivo, serão convidados a participar da pesquisa tendo o acesso a todos os exames e recebendo orientação genética, que para tal, será realizada de forma esclarecedora com a utilização de recursos didáticos (gravuras, desenhos, ilustrações) que auxiliam no entendimento.

Benefícios – a comunidade científica: a presente proposta possibilitará a formação e o treinamento de profissionais envolvidos com genética humana em diferentes especialidades, que atuam na UFG, e poderão futuramente atuar nesse campo na saúde pública. Assim, a comunidade que utiliza os serviços de saúde pública será beneficiada com os conhecimentos obtidos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segue os esclarecimentos quanto aos questionamentos realizados a respeito do projeto em questão:

- "...não há informações metodológicas de como os dados coletados serão transformados em material científico publicável ou passíveis de apresentação em eventos científicos".

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIÂNIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1153

E-mail: cep.ppl.ufg@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 1.190.071

Foi acrescentado um parágrafo no início do item Resultados Esperados no intuito de evidenciar que todo produto de uma pesquisa é, pelo menos, uma publicação.

- "Há dúvidas sobre a utilização de fotografias com identificação do participante.

Servirá a foto para identificar as características fenotípicas junto ao Dr. Antonio

Richieri-Costa como citado no Projeto, ou a mesma servirá para fundamentar as publicações científicas como citado no TCLE? Decidimos que toda e qualquer avaliação clínica será realizada na Vila São Cotollengo, não havendo a necessidade de se fotografar os participantes".

As imagens serão utilizadas tanto para a identificação fenotípica pela análise do Dr.

Richieri-Costa quanto para publicações. Um parágrafo foi acrescentado em metodologia no intuito de esclarecer essa questão.

- "Concluindo, sugere-se atentar: 1- ao aspecto do prejuízo psicológico frente ao diagnóstico genético; 2- sobre a publicização dos dados; 3- sobre o conflito de interesse (anuência da instituição participante ser também um dos pesquisadores elencados)".

Evidentemente que nenhum participante está livre de sofrer qualquer prejuízo psicológico diante da proposta do projeto. No entanto, o fato da possibilidade de esclarecer o fator gerador de tal anomalia traz conforto ao participante, bem como ter o conhecimento sobre risco de recorrência para outros indivíduos na família. Além disso, as informações sobre os resultados da pesquisa serão transmitidos de tal forma que esse suposto prejuízo psicológico seja minimizado.

Toda pesquisa tem como um dos produtos finais a publicação. Acreditamos que o projeto em questão tem potencial para a publicação de artigos em periódicos, anais de congressos, entre outros meios de divulgação.

O projeto apresentado versa sobre a investigação genética em indivíduos com fendas orais. A participação de uma equipe composta por geneticista, médico e dentista irá agregar suas expertises para o bom desenvolvimento do projeto. Do meu ponto de vista, não acredito que possa haver conflito de interesse, pelo contrário, interesse em um ponto em comum, ou seja, a obtenção dos resultados do projeto proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos presentes são:

1) Informações Básicas do Projeto; 2) Folha de Rosto; 4) TCLE; 5) Termo de compromisso; 6) Termo de Anuência; e 7) Projeto Detalhado.

O TCLE e o Termo de Assentimento garantem a participação voluntária, o princípio da autonomia e do sigilo

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIÂNIA

Telefone: (52)3521-1215

Fax: (52)3521-1153

E-mail: csp.pepi.ufg@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 1.190.671

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas por meio de explicações e acréscimo de informações no projeto de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Folha de Rosto	PLAT_BRASIL_1_001.jpg	03/02/2015 20:11:17		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_461563.pdf	03/02/2015 20:53:29		Aceito
Outros	termo_compromisso_craniofacial.pdf	13/04/2015 21:39:10		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_projeto_craniofacial.pdf	13/04/2015 21:38:01		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_CRANIOFACIAL_2015.pdf	13/04/2015 21:38:21		Aceito
Outros	termo_anuencia_craniofacial.pdf	13/04/2015 21:38:49		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_461563.pdf	13/04/2015 21:41:44		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_461563.pdf	30/06/2015 22:53:40		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CRANIOFACIAL1_CEP.pdf	30/06/2015 22:51:57		Aceito
Outros	carta_esclarecimentos_CEP_cranioface.pdf	30/06/2015 22:53:03		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIÂNIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1153 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 1.190.671

GOIÂNIA, 24 de Agosto de 2015

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Tâmará Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1153 E-mail: ocp.proi.ufg@gmail.com

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa a ser conduzida pelos pesquisadores Betânia Severino da Silva Maranhão (62-84804779), Nádia Aparecida Bérnago (62-35211481), Rosângela Hatori Rocha (62-35211215), Jalsi Tacon Arruda (62-35211481), sob a coordenação da Profa. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo, ICB1-UFG (telefones 62-35211481, 62-82269566).

O estudo a ser realizado se chama “Investigação diagnóstica em indivíduos com anomalias craniofaciais utilizando estratégias citogenéticas e moleculares.”. Nesta pesquisa serão avaliadas, por meio da análise dos cromossomos e do DNA, as possíveis alterações no material genético que poderiam causar a fenda palatina presente em você e/ou no seu filho.

Dos participantes da pesquisa serão coletados aproximadamente 5 mL de sangue periférico e a coleta de sangue será realizada por um(a) técnico(a) da equipe devidamente capacitado(a) para o procedimento. Da amostra do sangue periférico será feita a cultura de células para a análise dos cromossomos e será extraído o DNA, ambos serão submetidos aos procedimentos de análise citogenética e molecular no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética localizado no ICB1 da UFG, campus II. Amostras biológicas restantes serão armazenadas no laboratório para novos testes futuros. Você será avisado sobre esses testes, os quais só serão realizados com o seu consentimento.

Os riscos da coleta de sangue é que pode causar um pouco de desconforto físico e há possibilidade de aparecer uma mancha roxa (hematoma) na região.

Garantia de sigilo e privacidade: seus dados serão identificados por código e as informações obtidas na triagem do estudo serão guardadas sob sigilo e poderão ser publicadas em relatórios científicos sem sua identificação. Para uma melhor caracterização clínica é importante obter imagens do indivíduo a ser avaliado. Portanto você (ou seu filho) será fotografado e você pode escolher se suas fotos podem ser divulgadas em artigos científicos ou não.

A sua participação será voluntária. Não haverá qualquer valor monetário ou gratificações por ter participado da pesquisa e poderá em qualquer momento deixar a pesquisa sem qualquer consequência para a sua pessoa. Você será beneficiado com

as análises citogenética e molecular as quais podem explicar o surgimento da doença que está sendo investigada. Uma cópia deste Termo ficará com você que contém os telefones dos investigadores que esclarecerão qualquer dúvida que ocorrer durante a pesquisa. Se em algum momento durante esta pesquisa você se sentir lesado de alguma forma, você poderá solicitar indenização.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFG situado na Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, com o telefone de contato (62) 3521-1215, tem por função garantir a integralidade do participante na pesquisa e fazer valer os princípios éticos dentro das pesquisas que envolvem seres humanos, seguindo as normativas estabelecidas pela Resolução CNS 466/2012.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG _____ abaixo assinado, autorizo a minha participação neste estudo ou do menor _____ pelo qual sou responsável.

Fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento. No caso de novas pesquisas propostas com os dados coletados, serei informado e permitirei ou não sobre o uso do material biológico. Eu e/ou meu representante legal, em qualquer momento podemos retirar o consentimento e deixar de participar desta pesquisa, sem qualquer prejuízo de atendimento médico na Instituição.

Por favor assinale uma das opções abaixo:

- () permito a divulgação de imagens em publicações científicas
() não permito a divulgação de imagens em publicações científicas

Goiânia, _____ de _____ de _____.

Sujeito da pesquisa

Visto do pesquisador

Anexo 3. Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa a ser conduzida pelos pesquisadores Betânia Severino da Silva Maranhão (62-84804779), Nádia Aparecida Bérghamo (62-35211481), Rosângela Hatori Rocha (62-35211215), Jalsi Tacon Arruda (62-35211481), sob a coordenação da Profa. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo, ICB1-UFG (telefones 62-35211481, 62-82269566).

O estudo a ser realizado se chama “Investigação diagnóstica em indivíduos com anomalias craniofaciais utilizando estratégias citogenéticas e moleculares”. Seus pais (ou tutores legais) permitiram que você participe. Nesta pesquisa queremos saber se modificações no seu material genético pode causar a fenda palatina presente em você. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, localizado no ICB1 da UFG, campus II, onde analisaremos seus cromossomos e DNA. Para isso, precisaremos coletar aproximadamente 5mL de sangue e a coleta será realizada por uma pessoa que sabe bem como fazer isso. Amostras biológicas restantes serão armazenadas no laboratório para novos testes futuros. Você será avisado sobre esses testes, os quais só serão realizados com o seu consentimento.

Os riscos da coleta de sangue é que pode causar um pouco de desconforto físico e há possibilidade de aparecer uma mancha roxa na região. Mas também há coisas boas, pois com os resultados que obtivermos dessa pesquisa poderemos entender melhor por que você tem esse problema de saúde e assim poderemos auxiliar você e sua família.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa. Seus dados serão identificados por código e as informações obtidas na triagem do estudo serão guardadas sob sigilo e poderão ser publicadas em relatórios científicos sem sua identificação. Você será fotografado para que possamos avaliar melhor seu quadro clínico e você poderá escolher se suas fotos podem ser divulgadas em artigos científicos ou não.

A sua participação será voluntária. Não haverá qualquer valor monetário ou gratificações por ter participado da pesquisa e poderá em qualquer momento deixar a

pesquisa sem qualquer consequência para você. Se você tiver alguma dúvida poderá entrar em contato com os pesquisadores da pesquisa. Os números dos telefones estão escritos no início desse texto. Também poderá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFG, localizado na Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, com o telefone de contato (62) 3521-1215.

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG _____ abaixo assinado, aceito participar da pesquisa “Investigação diagnóstica em indivíduos com anomalias craniofaciais utilizando estratégias citogenéticas e moleculares” que tem como objetivo analisar o material genético em busca de modificações que esclareçam minha doença. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Goiânia, _____ de _____ de _____.

Sujeito da pesquisa

Visto do pesquisador

Anexo 4. Questionário de anamnese dos indivíduos portadores de fissura não sindrômica

FICHA DE ANAMNESE
1- INFORMAÇÕES GERAIS:
NOME:
DATA DE NASCIMENTO:
SEXO:
ENDEREÇO:
TELEFONE:
TIPO DE FISSURA:
2- HISTÓRICO FAMILIAR
2.1 GRAVIDEZ
TEMPO
INTERCORRÊNCIAS
USO DE ÁLCOOL
USO DE CIGARRO
USO DE MEDICAMENTOS (QUAIS?)
2.2 CONSANGUINIDADE
2.3 RECORRÊNCIA
PAI, MÃE OU IRMÃO COM FISSURA?
OUTROS PARENTES COM FISSURA?
3- OUTRAS ALTERAÇÕES
VISUAL
AUDITIVA
CARDÍACA
MEMBROS

Anexo 5. Tabela com dados de cada paciente analisado.

PACIENTE	IDADE	GÊNERO	TIPO DE FISSURA	RECORRÊNCIA NA FAMÍLIA	USO DE BEBIDA ALCOOÓLICA MATERNA OU PATERNA	TABAGISMO MATERNO OU PATERNO	USO DE MEDICAMENTOS MATERNO OU PATERNO	USO DE VITAMINAS MATERNA
CF021	16A04M	MASC	TRANSF	SIM (m)	N/R	N/R	N/R	N/R
CF022	34A04M	FEM	PRE-FOR	SIM (F)	N/R	N/R	N/R	N/R
CF034	03A01M	FEM	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF128	26A08M	MASC	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF001	08A	MASC	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF004	09A02M	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF005	42A01M	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF006	01A11M	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF003	04A01M	MASC	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF007	44A01M	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF008	21A2M	MASC	PRE-FOR	NAO	SIM	SIM	N/R	N/R
CF009	19A11M	MASC	PRE-FOR	NAO	SIM	N/R	N/R	N/R
CF023	21A06M	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF025	27A03M	MASC	TRANSF	NAO	N/R	SIM	N/R	N/R
CF026	43A03M	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF027	34A07M	FEM	TRANSF	SIM (f)	N/R	N/R	N/R	N/R

CF033	42A08M	FEM	TRANSF	NAO	N/R	SIM	N/R	N/R
CF035	41A11M	FEM	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF036	29A07M	FEM	PRE-FOR	NAO	N/R	SIM	N/R	N/R
CF050	21A09M	MASC	PRE-FOR	NAO	SIM	SIM	N/R	N/R
CF118	SI	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF119	SI	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF120	01A04M	MASC	PRE-FOR	SIM (tio)	N/R	N/R	N/R	N/R
CF121	SI	MASC	POS-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF122	SI	MASC	POS-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF126	17A06M	FEM	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF129	SI	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF131	SI	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF132	SI	MASC	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF133	SI	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF134	SI	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF154	SI	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF207	SI	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF208	SI	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF209	SI	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF210	SI	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R

CF211	5A	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF212	SI	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF213	SI	MASC	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF156	19A09M	FEM	TRANSF	SIM	SIM	SIM	N/R	N/R
CF159	20A	MASC	TRANSF	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF160	45A01M	FEM	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF162	11A02M	FEM	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF166	23A06M	FEM	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF167	38A05M	MASC	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF171	19A05M	FEM	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF172	23A09M	FEM	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF173	01A03M	FEM	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF174	21A	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF177	SI	MASC	TRANSF	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF178	SI	MASC	TRANSF	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF181	16A07M	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF182	08A05M	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF185	17A07M	FEM	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	SIM	N/R
CF187	17A07M	FEM	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF189	16A	MASC	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R

CF192	SI	FEM	TRANSF	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF193	SI	FEM	TRANSF	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF194	SI	MASC	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF195	30A	MASC	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF196	32A03M	FEM	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF197	08A	FEM	PRE-FOR	SIM	N/R	N/R	N/R	N/R
CF200	31A	MASC	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF201	44A	MASC	PRE-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF202	48A03M	MASC	PRE-FOR	NAO	SIM	N/R	N/R	N/R
CF203	63A04M	MASC	PRE-FOR	NAO	SIM	SIM	N/R	N/R
CF053	10A08M	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF055	11A09M	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF059	14A05M	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF062	17A03M	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF064	02A03M	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF069	25A03M	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF072	07A06M	MASC	TRANSF	NAO	SIM	N/R	N/R	N/R
CF075	02A11M	MASC	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF077	01A05M	MASC	PRE-FOR	SIM (pai	N/R	N/R	N/R	N/R
CF080	01A07M	MASC	TRANSF	SIM (pai	N/R	N/R	N/R	N/R

CF082	04A07M	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF084	05A09M	MASC	TRANSF	NAO	SIM	N/R	N/R	N/R
CF087	01A06M	FEM	POS-FOR	NAO	N/R	N/R	N/R	N/R
CF051	40 A 02M	FEM	TRANSF	NAO	N/R	N/R	N/R	NAO

SI: sem informação

Fem: feminino

Masc: masculino

N/R: não relatado

Anexo 6. Artigo submetido ao Journal of Dental Research

Mutation in GRHL3 gene in non-syndromic cleft lip/palate (JDR-16-1005)

Journal of Dental Research	
	
Mutation in GRHL3 gene in non-syndromic cleft lip/palate	
Journal:	Journal of Dental Research
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Reports
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Maranhão, Beatriz; Federal University of Goiás, Genetics Arruda, Jaisi; Federal University of Goiás, Genetics Oliveira, Camila; Federal University of Goiás, Genetics Bergamo, Nadia; Federal University of Goiás, Genetics Blando, Lucilene; Federal University of Goiás, Genetics
Keywords:	Cleft palate, Craniofacial biology/genetics, Craniofacial anomalies, Genetics, Genomics, Gene expression
Abstract:	Cleft lip with or without cleft palate (CL/P) is the most frequent craniofacial anomaly, corresponding to 2.5% of all birth defects. It occurs in about one in every 1,000 children born in the world, and this rate varies considerably according to geographic area and ethnic group. In Brazil, prevalence is estimated from 1:690 to 1:2,700. Advances in molecular and quantitative analysis provide new opportunities to identify genes and gene-environment interactions relevant to the etiology of this common and representative birth defect. The etiology of nonsyndromic CL/P (NSCL/P) remains elusive, but it has been suggested that causative genes of syndromic CL/P may contribute to NSCL/P. Therefore, in this study, we analyzed a set of 80 individuals with NSCL/P from Associação de Compensação Deformidades Faciais recruited from Midwest and Northern Brazil. We performed Multiplex Ligand-dependent Probe Amplification for the Interferon regulatory factor 6 and grainyhead-like transcription factor (GRHL3) genes. The results showed duplication on exon 4 of the GRHL3 gene in four unrelated individuals from Northern Brazil. To our knowledge, this study is the first to show duplication in the GRHL3 gene in individuals with NSCL/P. The contribution of GRHL3 genetic variants to NSCL/P susceptibility should be further investigated in different populations and cohorts.

SCHOLARONE[®]
Manuscripts

Mutation in gene GRHL3 in non-syndromic cleft lip/palate

Betânia Severino da Silva Maranhão; Jalsi Tacon Arruda; Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

Federal University of Goiás, Posgraduate Program of Biological Sciences, Goiânia, Goiás, Brazil.

Email: betaniamaranhao@hotmail.com

ABSTRACT

Cleft lip with or without cleft palate (CL/P) is the most frequent craniofacial anomaly, corresponding to 25% of all birth defects. It occurs in about one in every 1,000 children born in the world, and this rate varies considerably according to geographic area and ethnic group. In Brazil, prevalence is estimated from 1:650 to 1:2,700. Advances in molecular and quantitative analysis provide new opportunities to identify genes and gene–environment interactions relevant to the etiology of this common and representative birth defect. The etiology of nonsyndromic CL/P (NSCL/P) remains elusive, but it has been suggested that causative genes of syndromic CL/P may contribute to NSCL/P. Therefore, in this study, we analyzed a set of 80 individuals with NSCL/P from Associação de Combate as Deformidades Faciais recruited from Midwest and Northern Brazil. We performed Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification for the interferon regulatory factor 6 and grainyhead-like transcription factor (GRHL3) genes. The results showed duplication on exon 4 of the GRHL3 gene in four unrelated individuals from Northern Brazil. To our knowledge, this study is the first to show duplication in the GRHL3 gene in individuals with NSCL/P. The contribution of GRHL3 genetic variants to NSCL/P susceptibility should be further investigated in different populations and cohorts.

Keywords: cleft lip, cleft palate, polymorphism, IRF6, GRHL3.

INTRODUCTION

Craniofacial anomalies affect a significant proportion of the global society. The formation of the oral cavity comprises the interaction of different embryological processes, and thus any change or failure in these processes can lead to malformations (1). Cleft lip with or without

cleft palate (CL/P) is the most frequent craniofacial anomaly, corresponding to 25% of all birth defects (2). It occurs in about one in every 1,000 children, and this rate varies considerably according to geographic area and ethnic group (3). In Brazil, prevalence has been estimated from 1:650 to 1:2,700 (4;5). The registration of cases of birth defects, such as NSCL/P, has no standard because of the lack of an integrated and efficient information system that provides accuracy and reliability of data found in Brazil. In addition, data on the frequency of CL/P may vary according to researcher and country (6).

Approximately 70% of clefts are non-syndromic (NSCL/P), and only 30% have a syndromic form of cleft (7). The genetics of craniofacial anomalies, particularly of NSCL/P, is complex. The etiologies are many and involve single genes, chromosomal disorders, polygenic interactions, environmental risks, and gene–environment interaction (3; 8; 9; 10). Much has been learned about the genetics of craniofacial anomalies. However, the genetic basis of clefts remains poorly understood despite a number of studies (9). Given the similar phenotype between syndromic and non-syndromic forms of CL/P, causative genes identified in syndromic CL/P are considered promising candidate genes for NSCL/P as well (11).

One gene that is possibly linked to orofacial clefts is interferon regulatory factor 6 (IRF6). This gene is among those that have shown a convincing degree of consistency among different studies (12; 13). Mutations in this gene are known to cause two autosomal dominant allelic disorders, the van der Woude syndrome (SVW) and the popliteal pterygium syndrome (14; 15). The IRF6 gene has a causal relationship with SVW and is related in 12% of nonsyndromic CL/P (NSCL/P) (16; 17; 18). Mutations in this gene have been reported in patients with NSCL/P (19; 20; 21). Moreover, this gene has great potential to play a role in the etiology of isolated clefts (16; 22; 8).

Several studies evaluating SNPs in the IRF6 gene in individuals with cleft and their families in different populations have found a strong relationship between these polymorphisms and NSCL/P, thus confirming the significant association between the IRF6 gene and the occurrence of cleft (14;8;23;24;25;26; 2; 27; 28; 29; 21). Mutations in IRF6 have been identified in only 70% of families with VWS. A linkage study on a large Finnish pedigree with VWS identified a novel locus on 1p33–p36 (VWS2) rather than in IRF6 at 1q32–q41, providing further evidence of locus heterogeneity underlying this syndrome (30). Recently, grainyhead-like transcription factor 3 (GRHL3), which is located in VWS2 locus 1p34, has been identified as another VWS causative gene and is considered a novel candidate gene for NSCL/P (31).

Previous studies demonstrated that mutations in both IRF6 and GRHL3 cause almost the same clefting phenotypes. Furthermore, recent studies by GWAS and sequencing approaches have

indicated a missense variant (rs41268753) in GRHL3 increases the risk for NSCL/P cases in European ancestry (10;14;32;33;34;30;35; 31, 36). An association study genotyped multiple tag single nucleotide polymorphisms spanning the GRHL3 gene in Chinese NSCL/P patients and controls, but it did not reach a clear conclusion that any genotype or haplotype variant was associated with susceptibility to NSCL/P in this cohort (37). Another recent work failed to detect two missense variants (rs2486668 and rs545809) in GRHL3 contributing to NSCL/P risk in Chinese Han cases and controls (38).

In this study, we investigated the possible contribution between variants in IRF6 and GRHL3 genes and susceptibility to NSCL/P in West Central and Northern Brazilian populations previously screened for the IRF6 and GRHL3 gene mutation by polymerase chain reaction.

MATERIALS AND METHODS

Individuals

The ethical committee of the Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil, approved this study. Written informed consent was obtained from all subjects or their parents prior to participation in the study. The dentistry surgeon examined all subjects and diagnoses as NSCL/P based on clinical examination, medical records, and a detailed questionnaire. Blood samples were collected from 80 subjects from Midwest and Northern Brazil and evaluated at the Associação de Combate as Deformidades Faciais. Subjects in the control group were healthy individuals without a family history of orofacial clefts or other major congenital defects.

Molecular analysis

Genomic DNA was extracted from whole blood using a FlexiGene Genomic Purification Kit (Qiagen). The DNA concentration was determined using a NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). DNA samples were analyzed through Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) using the MLPA SALSA kit probemix P304-B1-IRF6 GRHL3 (Lot B1-0116), following the manufacturer's instructions (MRC-Holland). This MLPA assay was designed to detect deletions/duplications of one or more exons of the IRF6 and GRHL3 genes. All runs included DNA from normal controls to calibrate unknown samples. Probe amplification products were run on an ABI-3500 Genetic Analyzer using the GS500 size standard (Applied Biosystems). The GeneMapper software (Applied Biosystems) was used to size the PCR products and obtain peak areas. These data were exported to GeneMarker (Softgenetics) and Coffalyser software (MRC-Holland) for MLPA analysis.

RESULTS

We screened 80 individuals with NSCL/P, and this group was composed of 44 males and 36 females. Among this group, 45 had cleft lip and palate, 32 had cleft lip, and 3 had cleft palate. All 80 NSCL/P DNA samples, previously screened by PCR for IRF6 and GRHL3 gene mutation, were investigated by the MLPA technique. The MLPA performed on the samples revealed four non-related individuals with duplication on exon 4 of the GRHL3 gene in both software analyses of Coffalyser and Genemarker (Figure 1). All these four individuals presented with NSCL/P and were from Northern Brazil (Figure 2). DNA samples from the parents of these individuals who presented with microduplication were not available for the study. A new MLPA assay was performed for these four patients and the results were confirmed. No variation was found in the IRF6 gene.

Figure 1. Show a comparative analysis by GeneMarker and Coffalyser of one individual (cf197).

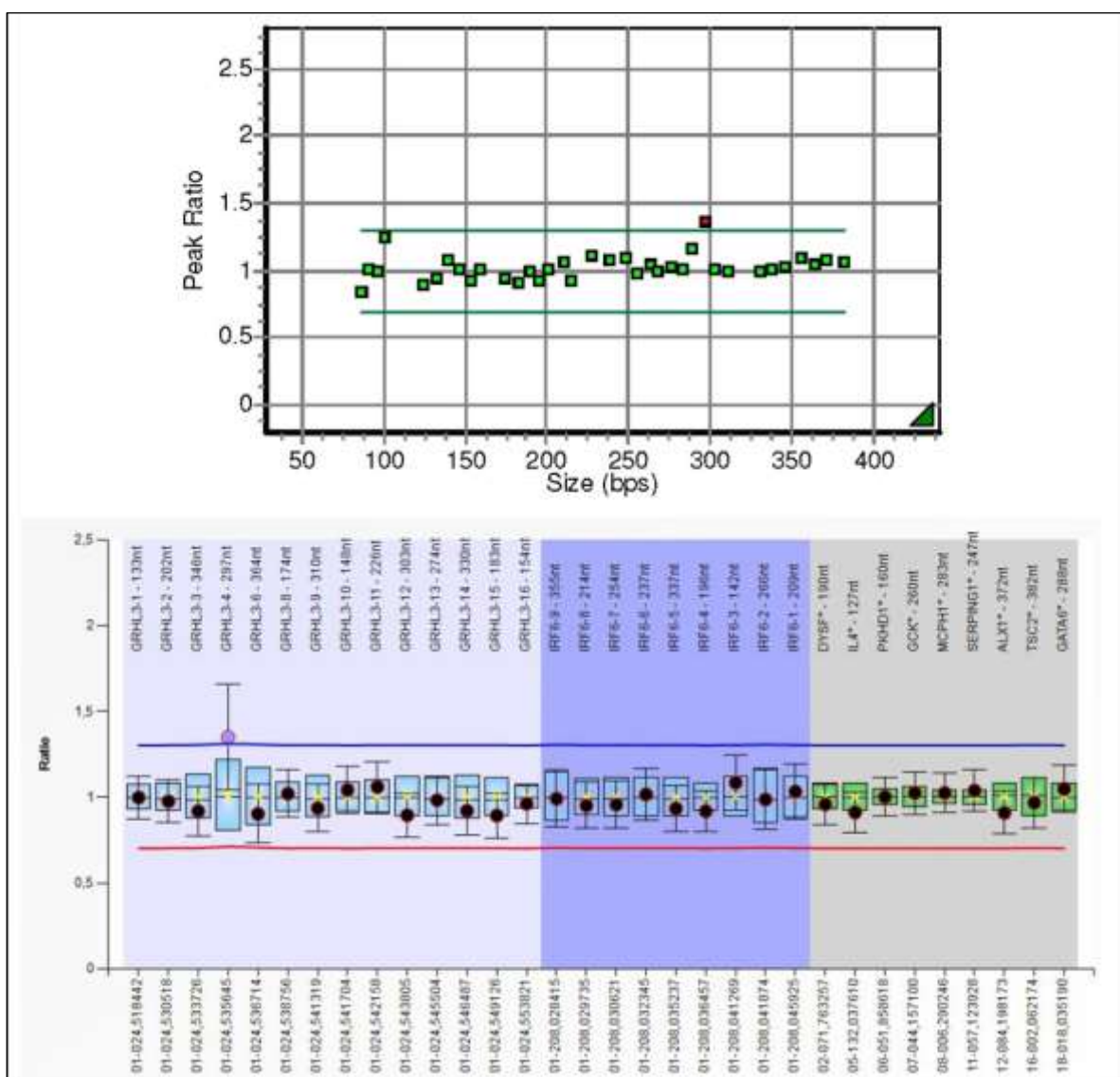


Figure 2. Show the four individuals with microduplication in exon 4 of the GRHL3.



DISCUSSION

In the present study, we searched for microdeletion or microduplication in a group of individuals with NSCL/P from Midwest and Northern Brazil. These individuals were screened for mutational analysis in the IRF6 and GRHL3 genes. We observed this group in an attempt to link them to ethnic and socio-economic factors in the region. However, miscegenation was shown to be high, and heterogeneous socioeconomic factors, detected a positive association between these factors and CL/P.

Mutations of the VWS causative gene IRF6 located in 1q32-q41 (VWS1 locus) were identified in NSCL/P and considered as the first gene related to clefts. In another VWS locus 1p34, mutations in GRHL3 were identified in VWS patients without IRF6 mutations. Therefore, GRHL3 is recognized as a novel causative gene of VWS and is a promising candidate gene for NSCL/P as well (16; 31). GRHL3 may be associated with the risk of NSCL/P, which awaits

verification across different ethnic populations (38). In the present work, we performed MLPA analysis to verify the contribution of the IRF6 and GRHL3 gene variations in the etiology of NSCL/P in a Brazilian cohort. We found microduplication on exon 4 of the GRHL3 gene in four unrelated individuals from Northern Brazil. These families had no history of recurrence, but the information obtained was only in the family core. Wu-Chou et al. (39) analyzed 80 NSCL/P individuals using the SALSA MLPA P304-A1 kit, which analyzed the IRF6 gene only. These authors found no deletion or duplication in the study group. In our study, we used the SALSA MLPA that included the GRHL3 gene (P304-B1 IRF6-GRHL3). We did not find any variation in IRF6, consistent with Wu-Chou et al. (2013). However, we did identify a variation in the GRHL3 gene, the first microduplication found in the GRHL3 gene in NSCL/P individuals.

GRHL3 mutations with deleterious and pathogenic effects identified in VWS families are rare and therefore seem unlikely to be prevalent among large populations. However, common genetic polymorphisms are considered to contribute to common diseases, such as NSCL/P (37). A recent study was performed on NSCL/P Chinese patients using SNPs of GRHL3 but did not give an affirmative answer if this gene could contribute to the etiology of NSCL/P in the Chinese Han population (37). Sequencing analysis revealed four novel truncating GRHL3 mutations, including two that were de novo in four families; all nine individuals harboring mutations had NSCL/P (36). Leslie et al. (10) performed a genome-wide association study on NSCL/P. They discovered a genome-wide significant association with a missense variant in GRHL3 (p.Thr454Met [c.1361C>T]; rs41268753) and replicated the result in an independent sample of case and control subjects. On the basis of these results, we observed that some studies showed the involvement of the GRHL3 gene in causing oral clefts. Other studies were not able to demonstrate this involvement. Nevertheless, this gene seemed to have a relationship with ethnicity. In the Brazilian cohort, we investigated individuals from Midwest and Northern Brazil.

Individuals in the northern region inhabit a small island, where the incidence of oral clefts has been reported to be high. Many of these individuals live in locations that are difficult to access on the island and do not seek medical care. Thus, a high rate of consanguineous marriages or recurrence may occur in the family. Among the four individuals that showed variation in DNA, no history of recurrence was found, but the parents did not know for certain. To our knowledge, this study is the first to show microduplication in the GRHL3 gene in individuals with NSCL/P. The contribution of GRHL3 genetic variants to NSCL/P susceptibility should be further investigated in different populations and cohorts.

REFERENCES

- 1- Moore K. *Embriologia Clínica*. 9ª ed. Ed. Elsevier, 2013. 376p.
- 2- Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, Russo ET, Vieira AR, Dodé C, Mohammadi M, Marazita ML, Murray JC. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Mar 13;104(11):4512-7.
- 3- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011 Mar; 12(3): 167–178.
- 4- Martelli-Júnior H, Bonan PR, Santos RC, Barbosa DR, Swerts MS, Coletta RD. An epidemiologic study of lip and palate clefts from a Brazilian reference hospital. *Quintessence Int*. 2008 Oct;39(9):749-52.
- 5- Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res*. 2009 Jan-Mar;23(1):38-42.
- 6- Monlleó IL, Barros AG, Fontes MI, Andrade AK, Brito Gde M, Nascimento DL, Gil-da-Silva-Lopes VL. Diagnostic implications of associated defects in patients with typical orofacial clefts. *J Pediatr (Rio J)*. 2015 Sep-Oct;91(5):485-92.
- 7- Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev*. 2005 Jun;15(3):270-8.
- 8- Mangold E, Ludwig KU, Nöthen MM. Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. *Trends Mol Med*. 2011 Dec;17(12):725-33.
- 9- do Rego Borges A, Sá J, Hoshi R, Viena CS, Mariano LC, de Castro Veiga P, Medrado AP, Machado RA, de Aquino SN, Messetti AC, Spritz RA, Coletta RD, Reis SR. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Brazilian population with high African ancestry. *Am J Med Genet A*. 2015 Oct;167A(10):2344-9.
- 10- Leslie EJ, Liu H, Carlson JC, Shaffer JR, Feingold E, Wehby G, Laurie CA, Jain D, Laurie CC, Doheny KF, McHenry T, Resick J, Sanchez C, Jacobs J, Emanuele B, Vieira AR, Neiswanger K, Standley J, Czeizel AE, Deleyiannis F, Christensen K, Munger RG, Lie RT, Wilcox A, Romitti PA, Field LL, Padilla CD, Cutiongco-de la Paz EM, Lidral AC, Valencia-Ramirez LC, Lopez-Palacio AM, Valencia DR, Arcos-Burgos M, Castilla EE, Mereb JC, Poletta FA, Orioli IM, Carvalho FM, Hecht JT, Blanton SH, Buxó CJ, Butali A, Mossey PA, Adeyemo WL, James O, Braimah RO, Aregbesola BS, Eshete MA, Deribew M, Koruyucu M, Seymen F, Ma L, de Salamanca JE, Weinberg SM, Moreno L, Cornell RA, Murray JC, Marazita ML. A Genome-wide Association Study of Nonsyndromic Cleft Palate Identifies an Etiologic Missense Variant in GRHL3. *Am J Hum Genet*. 2016 Apr 7;98(4):744-54.
- 11- Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet*. 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R73-81.
- 12- Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, Christensen K, Boyles AL, Daack-Hirsch S, Trung TN, Bille C, Lidral AC, Murray JC. Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. *PLoS One*. 2009;4(4):e5385.
- 13- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, Mossey PA, Little J, Steegers-

- Theunissen RP, Pennacchio LA, Schutte BC, Murray JC. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet.* 2008 Nov;40(11):1341-7.
- 14- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de Lima RL, Daack-Hirsch S, Sander A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Lammer EJ, Aylsworth AS, Ardinger HH, Lidral AC, Pober BR, Moreno L, Arcos-Burgos M, Valencia C, Houdayer C, Bahuau M, Moretti-Ferreira D, Richieri-Costa A, Dixon MJ, Murray JC. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet.* 2002 Oct;32(2):285-9.
- 15- de Lima RL, Hoper SA, Ghassibe M, Cooper ME, Rorick NK, Kondo S, Katz L, Marazita ML, Compton J, Bale S, Hehr U, Dixon MJ, Daack-Hirsch S, Boute O, Bayet B, Revencu N, Verellen-Dumoulin C, Vikkula M, Richieri-Costa A, Moretti-Ferreira D, Murray JC, Schutte BC. 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.* 2009 Apr;11(4):241-7.
- 16- Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J, Natsume N, Yoshiura K, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Moreno L, Arcos-Burgos M, Lidral AC, Field LL, Liu YE, Ray A, Goldstein TH, Schultz RE, Shi M, Johnson MK, Kondo S, Schutte BC, Marazita ML, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med.* 2004 Aug 19;351(8):769-80.
- 17- Paranaíba LM, Martelli-Júnior H, Oliveira Swerts MS, Line SR, Coletta RD. Novel mutations in the IRF6 gene in Brazilian families with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med.* 2008 Oct;22(4):507-11.
- 18- Kerameddin S, Namipashaki A, Ebrahimi S, Ansari-Pour N. IRF6 Is a Marker of Severity in Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *J Dent Res.* 2015 Sep;94(9 Suppl):226S-32S.
- 19- Desmyter L, Ghassibe M, Revencu N, Boute O, Lees M, François G, Verellen-Dumoulin C, Sznajer Y, Moncla A, Benateau H, Claes K, Devriendt K, Mathieu M, Van Maldergem L, Addor MC, Drouin-Garraud V, Mortier G, Bouma M, Dieux-Coeslier A, Genevieve D, Goldenberg A, Gozu A, Makrythanasis P, McEntagart U, Sanchez A, Vilain C, Vermeer S, Connell F, Verheij J, Manouvrier S, Pierquin G, Odent S, Holder-Espinasse M, Vincent-Delorme C, Gillerot Y, Vanwijck R, Bayet B, Vikkula M. 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.* 2010;1(2):67-74.
- 20- Rutledge KD, Barger C, Grant JH, Robin NH. IRF6 mutations in mixed isolated familial clefting. *Am J Med Genet A.* 2010 Dec;152A(12):3107-9.
- 21- Velázquez-Aragón JA, Alcántara-Ortigoza MA, Estandia-Ortega B, Reyna-Fabián ME, Méndez-Adame CD, González-Del Angel A. Gene Interactions Provide Evidence for Signaling Pathways Involved in Cleft Lip/Palate in Humans. *J Dent Res.* 2016 Oct;95(11):1257-64.
- 22- Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008 Feb;87(2):119-25.
- 23- Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A.* 2005 Sep 1;137A(3):259-62.
- 24- Ghassibé M, Bayet B, Revencu N, Verellen-Dumoulin C, Gillerot Y, Vanwijck R, Vikkula M. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population. *Eur J Hum Genet.* 2005 Nov;13(11):1239-42.

- 25- Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, Carinci F. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am J Hum Genet.* 2005 Jan;76(1):180-3.
- 26- Srichomthong C, Siriwan P, Shotelersuk V. Significant association between IRF6 820G->A and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Thai population. *J Med Genet.* 2005 Jul;42(7):e46.
- 27- Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Linkage disequilibrium between IRF6 variants and nonsyndromic cleft lip/palate in the Chilean population. *Am J Med Genet A.* 2008 Oct 15;146A(20):2706-8.
- 28- Jia ZL, Li Y, Li L, Wu J, Zhu LY, Yang C, Chen CH, Shi B. Association among IRF6 polymorphism, environmental factors, and nonsyndromic orofacial clefts in western china. *DNA Cell Biol.* 2009 May;28(5):249-57.
- 29- Tang W, Du X, Feng F, Long J, Lin Y, Li P, Liu L, Tian W. Association analysis between the IRF6 G820A polymorphism and nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate in a Chinese population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2009 Jan;46(1):89-92.
- 30- Koillinen H, Wong FK, Rautio J, Ollikainen V, Karsten A, Larson O, Teh BT, Huggare J, Lahermo P, Larsson C, Kere J. Mapping of the second locus for the Van der Woude syndrome to chromosome 1p34. *Eur J Hum Genet.* 2001 Oct;9(10):747-52.
- 31- Peyrard-Janvid M, Leslie EJ, Kousa YA, Smith TL, Dunnwald M, Magnusson M, Lentz BA, Unneberg P, Fransson I, Koillinen HK, Rautio J, Pegelow M, Karsten A, Basel-Vanagaite L, Gordon W, Andersen B, Svensson T, Murray JC, Cornell RA, Kere J, Schutte BC. Dominant mutations in GRHL3 cause Van der Woude Syndrome and disrupt oral periderm development. *Am J Hum Genet.* 2014 Jan 2;94(1):23-32.
- 32- Huang Y, Wu J, Ma J, Beaty TH, Sull JW, Zhu L, Lu D, Wang Y, Meng T, Shi B. Association between IRF6 SNPs and oral clefts in West China. *J Dent Res.* 2009 Aug;88(8):715-8.
- 33- Shi J, Song T, Jiao X, Qin C, Zhou J. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the IRF6 and TFAP2A in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCLP) in a northern Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jul 15;410(4):732-6.
- 34- Paranaiba LM, Bufalino A, Martelli-Júnior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD. Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis.* 2010 Mar;16(2):193-7.
- 35- de la Garza G, Schleiffarth JR, Dunnwald M, Mankad A, Weirather JL, Bonde G, Butcher S, Mansour TA, Kousa YA, Fukazawa CF, Houston DW, Manak JR, Schutte BC, Wagner DS, Cornell RA. Interferon regulatory factor 6 promotes differentiation of the periderm by activating expression of Grainyhead-like 3. *J Invest Dermatol.* 2013 Jan;133(1):68-77.
- 36- Mangold E, Böhmer AC, Ishorst N, Hoebel AK, Gültepe P, Schuenke H, Klamt J, Hofmann A, Gözl L, Raff R, Tessmann P, Nowak S, Reutter H, Hemprich A, Kreusch T, Kramer FJ, Braumann B, Reich R, Schmidt G, Jäger A, Reiter R, Brosch S, Stavusis J, Ishida M, Seselgyte R, Moore GE, Nöthen MM, Borck G, Aldhorae KA, Lace B, Stanier P, Knapp M, Ludwig KU. Sequencing the GRHL3 Coding Region Reveals Rare Truncating Mutations and a Common Susceptibility Variant for Nonsyndromic Cleft Palate. *Am J Hum Genet.* 2016 Apr 7;98(4):755-62.
- 37- Wang Y, Sun Y, Huang Y, Pan Y, Jia Z, Ma L, Ma L, Lan F, Zhou Y, Shi J, Yang X, Zhang L, Jiang H, Jiang M, Yin A, Cheng J, Wang L, Yang Y, Shi B. Association study between Van der Woude Syndrome causative gene

GRHL3 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chinese cohort. *Gene*. 2016 Aug 15;588(1):69-73.

38- He M, Bian Z. Lack of Association between Missense Variants in GRHL3 (rs2486668 and rs545809) and Susceptibility to Non-Syndromic Orofacial Clefts in a Han Chinese Population. *PLoS One*. 2016 Jul 26;11(7):e0159940.

39- Wu-Chou YH, Lo LJ, Chen KT, Chang CS, Chen YR. A combined targeted mutation analysis of IRF6 gene would be useful in the first screening of oral facial clefts. *BMC Med Genet*. 2013 Mar 20;14:37.