PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

ESTUDO DO GENE *IRF6* EM UMA AMOSTRA DE PACIENTES PORTADORES DE FISSURAS LABIOPALATINAS NÃO-SINDRÔMICAS POR MEIO DA TRIAGEM DE MUTAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO.

por

Carla Costa Moreira

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos
obrigatórios para obtenção do
título de MESTRE EM ODONTOLOGIA
na área de concentração em
Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Linha de Pesquisa: Defeitos da Face

Orientador: Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior

Co-orientadora: Prof.Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno

Porto Alegre

2007

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho, assim como, toda a minha vida, a meus amados e admiráveis pais, Armando (*in memoriam*) e Maria Aparecida, aos meus irmãos, Andréa, Armando e Sabrina. Às minhas amigas, Ana Carolina Uchoa, Mara Chagas Diógenes e Geilma Vieira. E, minha iluminada sobrinha, Luíza Fernanda, que nos trouxe felicidade e as melhores razões para se viver. Amo-os profundamente e infinitamente.

Amigos

Tenho amigos que não sabem o quanto são meus amigos.

Não percebem o amor que lhes devoto e a absoluta necessidade que tenho deles.

A amizade é um sentimento mais nobre do que o amor, eis que permite que o objeto dela se divida em outros afetos, enquanto o amor tem intrínseco o

ciúme, que não admite a rivalidade.

E eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!

Até mesmo aqueles que não percebem o quanto são meus amigos e o quanto minha vida depende de suas existências...

A alguns deles não procuro, basta-me saber que eles existem.

Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida.

Mas, porque não os procuro com assiduidade, não posso lhes dizer o quanto gosto deles. Eles não iriam acreditar.

Muitos deles estão lendo esta crônica e não sabem que estão incluídos na sagrada relação de meus amigos.

Mas é delicioso que eu saiba e sinta que os adoro, embora não declare e não os procure.

E às vezes, quando os procuro, noto que eles não tem noção de como me são necessários, de como são indispensáveis ao meu equilíbrio vital, porque

eles fazem parte do mundo que eu, tremulamente, construí e se tornaram alicerces do meu encanto pela vida.

Se um deles morrer, eu ficarei torto para um lado.

Se todos eles morrerem, eu desabo!

Por isso é que, sem que eles saibam, eu rezo pela vida deles.

E me envergonho, porque essa minha prece é, em síntese, dirigida ao meu bem estar. Ela é, talvez, fruto do meu egoísmo.

Por vezes, mergulho em pensamentos sobre alguns deles.

Quando viajo e fico diante de lugares maravilhosos, cai-me alguma lágrima por não estarem junto de mim, compartilhando daquele prazer...

Se alguma coisa me consome e me envelhece é que a roda furiosa da vida não me permite ter sempre ao meu lado, morando comigo, andando comigo, falando comigo, vivendo comigo, todos os meus amigos, e, principalmente os que só desconfiam ou talvez nunca vão saber que são meus amigos!

A gente não faz amigos, reconhece-os.

(Vinícius de Morais)

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela oportunidade oferecida através do financiamento deste programa de Pós-graduação.

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno, do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, por todo apoio, dedicação e confiança.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior. Seu apoio, atenção, dedicação, sabedoria foram meus guias e força na concretização deste trabalho.

Aos pacientes, por sua participação e autorização na pesquisa.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul-PUCRS e à Faculdade de Odontologia, funcionários, alunos e professores, pela oportunidade do desenvolvimento do Programa de Pós-graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

À Universidade de São Paulo e ao Centro de Estudos do Genoma Humano-USP, funcionários, alunos e professores, por todo apoio e financiamento do aprendizado e pesquisa da Dissertação.

Aos meus professores do Mestrado, em especial, Dr.Cláiton Heitz, Dr. Rogério Pagnoncelli, Dra. Daniela Nascimento, Dra. Maria Antonieta, Dr. Gilson Beltrão, Dr. Rogério Belle, Dra. Liliane Soares Yurgel e Dra. Karen Cherubini, pelos valiosos ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. Jefferson Braga e toda sua equipe da Microcirurgia Reconstrutiva, do HSL-PUCRS, por toda atenção e dedicação.

À minha amada família, pais e irmãos, por toda atenção, apoio, carinho, compreensão, desprendimento, dedicação e amor. Todas as conquista e sonhos seriam impossíveis, e sem razão, se não fosse por vocês.

A todos os meus colegas e amigos da Pós-graduação da Odontologia na PUCRS, foram difíceis, mas ótimos e gratificantes momentos.

À Prof. Dra. Clarice Alho e ao pesquisador Dr. Everaldo Franca, da Faculdade de Biociência da PUCRS.

Aos meus amigos do Instituto de Biociências, Laboratório de Genética de Desenvolvimento Humano, Centro de Estudos do Genoma Humano-USP, Nélio Alessandro, Beatriz Burin, Fernanda Jehee, Cibele Marsoti, Daniela Bueno, Oscar, Gustavo Alencastro, Roberto Fanganielo, Guilherme Orabona, Karine Griesi, Andréa, Érica Kague, Érica Yeh, Mayara Ribeiro, Camila, por toda atenção, paciência e apoio.

À toda minha família, tios, primos, cunhados, especialmente à minha avó Doralice Costa e à tia Emy, por todo carinho, atenção e amor.

À Dra. Nilza Pereira da Costa e Dr.Manoel Sant´Anna Filho, por todo apoio e confiança.

Às minhas amigas Raquel Pessoa, Lúcia Sperb, Letícia Post, Graziela Westphalen e Cristina Reck, pela amizade e apoio necessários à realização do curso.

Às minhas amigas de infância, Patrícia Paiva, Ana Aline Simões e Cláudia Albuquerque, pro todo amor e amizade.

À família de amigos gaúchos, Antonio Nunez, Patrícia e Janaína, por todo suporte emocional e carinho.

Ao meu amigo, conselheiro e eterno professor, Josimário da Silva, da UFPE, pela confiança, apoio e amizade.

Ao Dr. Paulo Germano, Chefe do Serviço de Atendimento aos Portadores de Fissura Lábio Palatina, do Hospital Universitário, da Universidade Federal da Paraíba, por todo o apoio.

Ao Dr. Dante Bello, por toda atenção, compreensão e dedicação profissional.

Aos professores da graduação na Universidade Federal da Paraíba, por todos os ensinamentos e apoio, especialmente ao Prof. Dr. Marcos Paiva, por todo incentivo, dedicação e apoio.

Aos meus amigos do coração, Paula Brinckman, Lisandra Pinheiro, Fernanda Leite, Daniel Pinho, Fernanda Zanon, Aline Maria, Letícia Frantz, Ingrid Rosa, Gustavo Meneses, Cristiane Pauletti, Leonílson Gaião, Aracelly Xavier, Emerson, Luiz Barnei, Fernando Fernandes, por todo carinho.

A todos os Cirurgiões, de todas as áreas, que me transmitiram, através de suas práticas, os meus primeiros, e fundamentais, ensinamentos e paixão pela profissão.

E, enfim, aos obstáculos, que me transformaram em um ser humano ainda mais forte.

Poeminho do Contra

Todos esses que aí estão

Atravancando meu caminho,

Eles passarão...

Eu passarinho!

(Mário Quintana)

RESUMO

As fissuras labiais com ou sem fissura palatina (FL/P) e as fissuras palatinas (FP) são anomalias orofaciais comuns. As fissuras quando constituem a única malformação são classificadas como não sindrômicas (FL/PNS ou FPNS) e em sindrômicas, quando associadas a outros sinais clínicos. Têm-se postulado um modelo de herança multifatorial para as FL/P e FP não sindrômicas. Nestes casos, o risco de repetição de um segundo caso na genealogia é baixo, estimado em 4%. Já as fissuras sindrômicas podem ser causadas por aberrações cromossômicas, mutações gênicas ou ter origem teratogênica. Entre as formas sindrômicas, se destaca a síndrome de Van der Woude (SVW), que é uma condição mendeliana de herança autossômica dominante. Mutações no gene *IRF6* são responsáveis pela maioria dos casos desta síndrome. Esta síndrome se caracteriza pela presença de comissuras ("*pits*") no lábio inferior, fissura labial e palatina. Sendo o espectro de variabilidade clínica destas alterações muito amplo, torna-se difícil distinguir clinicamente os pacientes com a SVW que não apresentam "*pits*" daqueles portadores das formas de FL/P ou FP não sindrômica. A distinção clínica entre estas duas formas é extremamente importante, pois o risco de recorrência é muito diferente entre os casos de fissura não sindrômica (4%) e SVW (50%). A única maneira de se distinguir os casos de SVW sem "*pits*" daqueles com fissuras não sindrômicas é por meio da análise do gene *IRF6*. Estima-se que 2% dos casos de fissurados não-sindrômicos representem casos de SVW. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo principal verificar qual a proporção de casos com mutação patogênica em *IRF6*, que são portadores da SVW, entre pacientes diagnosticados com fissura lábio-palatino ou fissura palatina não-sindrômica (FL/PNS e FPNS, respectivamente). Os éxons com maior freqüência de mutação entre os pacientes com SVW foram analisados por sequenciamento direto em 37 pacientes com fissura não sindrômica. Não encontramos nenhuma mutação patogênica nesses [éxons entre estes pacientes, porém, foi verificada qualquer presença dos SNPs e suas freqüências, rs225371 de 2.2% (1 alelo/ 44 cromossomos); rs2235373 de 6.8% (3 alelos/44 chromossomos). Nossos resultados mostraram que numa amostra obtida de um banco de DNA de fissurados não sindrômicos de uma população brasileira específica não se observou nenhum caso de SVW dada pela análise do gene IRF6. A fim de melhor caracterizar a SVW numa população brasileira representativa dever-se-á aumentar o número de indivíduos analisados e expandir o estudo a populações de fissurados de outras regiões no Brasil.

Palavras-chave: fissura lábio-palatina; *IRF6*; síndrome de Van der Woude; sequenciamento; estudos clínicos.

ABSTRACT

Cleft lip and palate (CLP) are common orofacial anomalies. Clefts, as single entities, are classified as either non-syndromic or syndromic, whenever the characteristic clefts are associated with additional clinical signs. It has been proposed that non-syndromic CLP alterations are related to multifactorial inheritance and in these cases the risk of a second familial case is low, around 4%. On the other hand, syndromic clefts may be caused by chromossomic aberrations, mutations or alterations of teratogenic origin. Among the syndromic forms of CLP, the Van der Woude Syndrome (VWS) is a mendelian autossomic dominant alteration. Mutations of the *IRF6* gene have been linked to this alteration, which manifests the presence of pits located in the lower lip along with CLP. These are highly variable clinical entities, whose clinical overlapping signs make it difficult to properly diagnose the disease solely by its clinical features. A sound distinction between the two forms, non-syndromic and the VWS, however, is imperative since the familial recurrence risk differs significantly between the non-syndromic (4%) and the VWS (50%). One of the molecular approaches to properly discriminate between the non-syndromic CLP and the VWS is through the analysis of the *IRF6* gene. It has been estimated that two-percent of the non-syndromic CLP clinically diagnosed are indeed VWS cases. The aim of the present investigation was to assess pathological mutations of the *IRF6* gene in a population originally diagnosed as non-syndromic CLP carriers in an attempt to disclose cases of the VWS syndrome. To that end, the three *IRF6* exons most frequently associated with the VWS, namely exons 3, 4 and 7, were analysed through amplification and direct automated sequencing of genomic DNA isolated from 37 subjects presenting non-syndromic clefts. In this population, no pathological mutation yet characterized in the aforementoioned exons were detected. Nevertheless, two non-pathological SNPs that have been previously reported were found, the SNP rs225371 (2.2%; 1 allele/ 44 chromossomes) and the SNP rs2235373 (6.8% ;3 alleles/44 chromossomes). The results presented here in failed to detect VWS cases among patients diagnosed as non-syndromic L/PC as determined by sequencing of the *IRF6* gene. In order to more efficiently characterize the VWS from a representative brazilian population, further studies involving more subjects, as well as individuals from other regions of the country are warranted.

Key words: Clefts lip and palate; *IRF6* polimorphism; Van der Woude Syndrome; DNA sequencing; clinical trials.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS 9

LISTA DE TABELAS 10

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 11

1. INTRODUÇÃO 12

2. REVISÃO DA LITERATURA 14

2.1. Desenvolvimento Embrionário do Lábio e Palato 14

2.2. Epidemiologia das Fissuras Labiopalatinas 25

2.3. Etiologia: Fissuras Labiopalatinas e Genética 27

2.4. Fatores Reguladores de Interferon (IRFs) 29

2.5. IRF6 (Fator Regulador de Interferon-6) 32

2.6. IRF6, Síndrome de Van der Woude (SVW), FLPNS e FPNS 33

3. HIPÓTESE 40

4. PROPOSIÇÃO 40

5. MATERIAIS E MÉTODOS 41

5.1. Aspectos Éticos 41

5.2. Amostra e Seqüências Alvo do Estudo 41

5.2.1. Amplificação dos exons de interesse 42

5.2.2. Amplificação dos DNA degradados 46

5.2.3. Purificação dos amplicons 47

5.2.4. Reação de sequenciamento 47

5.2.5. Precipitação da reação de sequenciamento por *Sephadex*® 48

5.2.6. Estatística e Análise dos Polimorfismos 50

6. RESULTADOS 51

6.1. Caracterização da Amostra 51

6.2. Análise do gene IRF6 em pacientes FLPNS 54

7. DISCUSSÃO 60

8. CONCLUSÕES 65

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

ANEXO A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 74

ANEXO B: Carta do CEP 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Arcos branquiais na 5ª. semana de gestação 14
Figura 2.2: Proeminências das regiões frontonasal e mandibular 15
Figura 2.3: Proeminências nasal mediana (amarelo); nasal lateral (azul); maxilar (vermelho) e mandibular 16
Figura 2.4: Esquema representativo das proeminências nasal medial (amarelo); nasal lateral (azul); maxilar (vermelho) e mandibular 17
Figura 2.5: Placóides Nasais 18
Figura 2.6: Proeminências Nasais (laterais-verde; mediais-amarela) e Maxilar (vermelha) 18
Figura 2.7: Língua Interposta entre os palatinos secundários 20
Figura 2.8: Fusão dos processos palatinos (laranja), acima da língua (vermelho) 20
Figura 2.9: Fusão dos Processos do Palato Secundário 21
Figura 2.10: Processos nasais e maxilares 22
Figura 2.11: Pré-maxila (amarelo) 23
Figura 2.12: Tipos de fissura 25
Figura 2.13: Síndrome de Van der Woude 35
Figura 2.14:Distribuição das mutações presentes nos exons do gene *IRF6* 37
Figura 5.1: Check-gel do produto de PCR do exon 7 45
Figura 5.2: Check-gel do produto de PCR do exon 3 45
Figura 5.3: Check-gel da amplificação das amostras de DNAs degradados 46
Figura 6.1:Distribuição dos pacientes por sexo e região de origem. 52
Figura 6.2: Distribuição dos pacientes por sexo e tipo de fissura. 53
Figura 6.3: Imagem do SNP rs2235371 55
Figura 6.4: Imagem do SNP rs2235373 56
Figura 6.5: Imagem do SNP rs2235371 57
Figura 6.6: Imagem do SNP rs2235373 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Mutações *IRF6* 36
Tabela 5.1: Seqüência de bases do amplicon do exon 3 do gene IRF6 43
Tabela 5.2: Seqüência de bases do amplicon do exon 4 do gene IRF6 43
Tabela 5.3: *Seqüência de bases do amplicon do exon 7 do gene IRF6* 43
Tabela 5.4: Concentração final dos componentes da reação de PCR 44
Tabela 5.5: Componentes da reação de sequenciamento 48
Tabela 6.1: Distribuição dos pacientes por sexo e raça 51
Tabela 6.2: Distribuição dos pacientes por região 52
Tabela 6.3: Distribuição dos pacientes por tipo de fissura. 53
Tabela 6.4: Distribuição das avaliações por tipo de Exon 54
Tabela 6.5: Polimorfismos já caracterizados identificados no exon e intron 7 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%- porcentagem
°C- grau(s) centígrado(s)
∞- infinito
BCL3 - Célula do tipo B do linfoma
BFB- *Bromophenol Blue*
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato
EXO- Exonuclease
FL/P- Fissura lábio e/ou palato
FL/PNS- Fissura lábio e/ou palatina não-sindrômica
FOPUCRS– Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FPNS- Fissura palatina não-sindrômica
g- grama
H_2O- água
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS
IRF-6 (*Interferon Regulatory Factor 6)* - Fator Regulatório de Interferon 6
min- minuto
ml- mililitro
mM- milimolar
MSX1- *Muscle Segment Homeobox* - Segmento Muscular Homeobox 1
ng- nanograma
pb- pares de base
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RARA - Receptor Alfa para Ácido Retinóico (Retinoic Acid Receptor Alpha)
RNA – Ácido ribonucléico
rpm- rotações por minuto
SAP- *Shrimp Alkaline Phosphatase*
SNP- Polimorfismo de nucleotídeo único!!!!!!
SVW- Síndrome de Van der Woude
TBE – Tris, ácido bórico e edta
TGF-β - *Transforming Growth Factor Beta* - Fator de Crescimento Transformador Beta
TGFα- *Transforming Growth Factor Alpha* - Fator de Crescimento Transformador Alfa
U/µl- unidades por microlitro
USP- Universidade de São Paulo
UV- ultra-violeta
V- volt
µl – microlitro
µM – micromolar

1. INTRODUÇÃO

As fissuras labiais com ou sem fissura palatina (FL/P) e as fissuras palatinas (FP) são anomalias orofaciais bastante comuns, que representam um problema de saúde pública relevante, sendo considerado a segunda anomalia congênita mais comum (Fick e Marchioro, 1998). Correspondem a aproximadamente 25% de todos os defeitos congênitos (Slavkin, 1992).

Observa-se que as fissuras labiais e palatinas apresentam alta incidência que varia entre as diversas populações estudadas (Fraser, 1970; Vanderas, 1987; e Tolarova e Cervenka, 1998). Há várias evidências de que essas malformações podem ser de ordem genética e/ou ambiental, podendo estes fatores atuarem separadamente ou em conjunto, de acordo com o modelo multifatorial e com limiar (Vieira e Orioli, 2001; Murray, 2002).

A investigação dos fatores genéticos relacionados à formação da face tem sido realizada por vários pesquisadores em diversos países e envolve diferentes estratégias metodológicas. Nestes últimos 20 anos, vários genes responsáveis para as formas sindrômicas e não-sindrômicas de fissuras faciais têm sido identificados em alguns grupos populacionais. Contudo, é ainda necessária a confirmação destes achados em outras populações (Schutte e Murray, 1999). Uma vez confirmada à participação desses genes na formação das fissuras, seria possível compreender melhor o desenvolvimento do lábio, palato e mandíbula ao nível molecular e avaliar com maior precisão e confiabilidade os riscos de ocorrência dessas fissuras (Vieira e Orioli, 2003).

Assim sendo, estudos que contribuam com a identificação destes genes são de grande importância, não só para a compreensão da etiologia desta malformação, como também para o aconselhamento genético.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Desenvolvimento Embrionário do Lábio e Palato

Para uma melhor compreensão do mecanismo que leva às fissuras orofaciais, é importante que se entenda o desenvolvimento normal das estruturas envolvidas nestas patologias, através da descrição das principais etapas da formação facial embriológica (Martins, 2002).

O desenvolvimento facial na espécie humana ocorre no período embrionário, que vai do 1ª. a 2ª mês gestacional (Moore e Persaud, 1994). A Figura 2.1 apresenta os quatro arcos branquiais na 5ª. semana de gestação. Na imagem menor observa-se o primeiro arco branquial colorido em verde, o segundo em laranja, o terceiro em amarelo e o quarto em rosa.

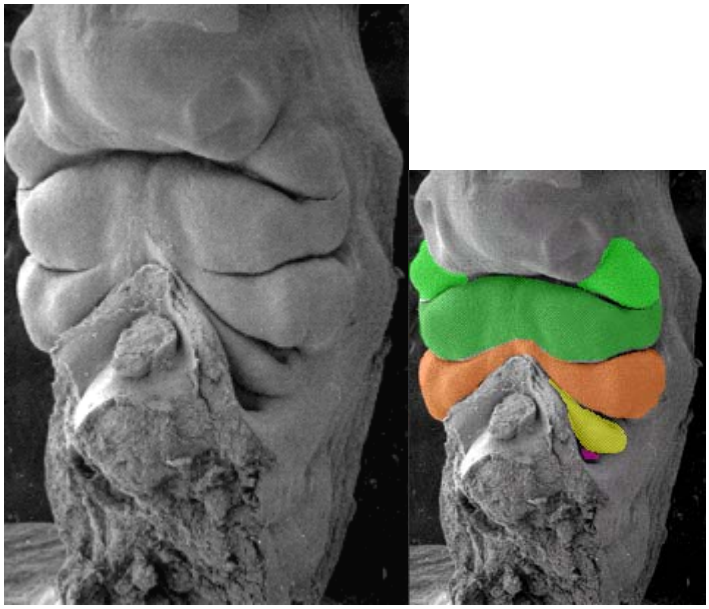


Figura 2.1: Arcos branquiais na 5ª. semana de gestação (Sulik *et al*., 2006)

O desenvolvimento facial ocorre ao redor de um estomódio primitivo, a partir de cinco proeminências derivadas da proliferação de células da crista neural (células

ectodérmicas), sendo uma frontonasal, duas maxilares e duas mandibulares. Essas proeminências aparecem no início da quarta semana de vida intra-uterina e migram para as regiões da face e da cabeça, onde atuam como mesênquima (ectomesênquima) (Gorlin et al., 1990; Moore e Persaud, 1994). A Figura 2.2 ilustra as proeminências das regiões frontonasal e mandibular.

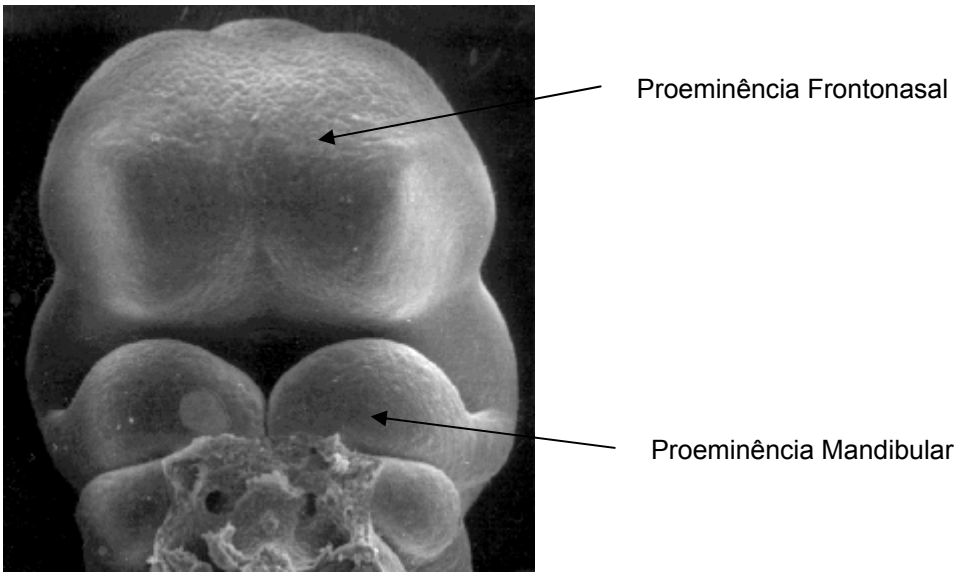


Figura 2.2: Proeminências das regiões frontonasal e mandibular (Sulik et al., 2006).

A face se desenvolve, então, a partir dessas cinco proeminências durante a quarta e a oitava semana de gestação. Ao final desse período, a face já apresenta um aspecto humano (Moore e Persaud, 1994). A rápida expansão proliferativa e os eventos morfogenéticos complexos que coordenam o desenvolvimento facial determinam a importante influência desta estrutura através dos estímulos genéticos e ambientais, fornecendo uma explanação para a incidência elevada de malformações do terço médio da face. Dentre as malformações congênitas que ocorrem durante a formação da face, as fissuras do lábio e/ou palatina (FL/P) são mais freqüentes e merecem estudos mais detalhados (Cox, 2004).

As células da crista neural (células ectodérmicas) participam da formação do tecido esquelético e conjuntivo da face e de todos os tecidos do dente (exceto o esmalte), exercendo, então, um papel fundamental na morfogênese facial (Gorlin et al., 2001).

As porções laterais do lábio superior, a maior parte da maxila e o palato secundário se formam a partir da fusão lateral das proeminências maxilares e mandibulares (Moore e Persaud, 1994). A Figura 2.3 ilustra as proeminências maxilares, em laranja; nasais laterais, em verde e nasal mediana, em amarelo e a Figura 2.4 representa um ilustração esquemática dessa imagem embriológica.

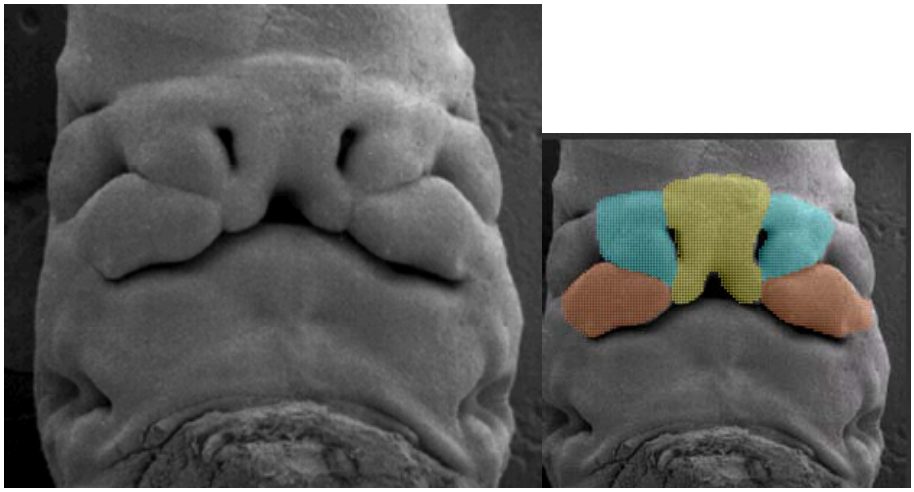


Figura 2.3: Proeminências nasal mediana (amarelo); nasal lateral (azul); maxilar (laranja) e mandibular (Sulik et al., 2006)

Entre as cinco proeminências citadas, a frontal dá origem aos olhos, à testa, ao dorso nasal e à ponta nasal, ao filtro labial e à pré-maxila. As asas nasais são derivadas das proeminências nasais laterais e o septo nasal das proeminências nasais mediais. O par de proeminências maxilares forma as bordas laterais do lábio superior, a maxila e as bochechas. Já o par de proeminências mandibulares dá origem à mandíbula, ao mento, ao lábio inferior e à porção interior da face. Isto ocorre quando as proeminências mandibulares se fundem, normalmente na quarta

semana e o sulco entre elas desaparece antes do final da quinta semana (Moore e Persaud, 1994).

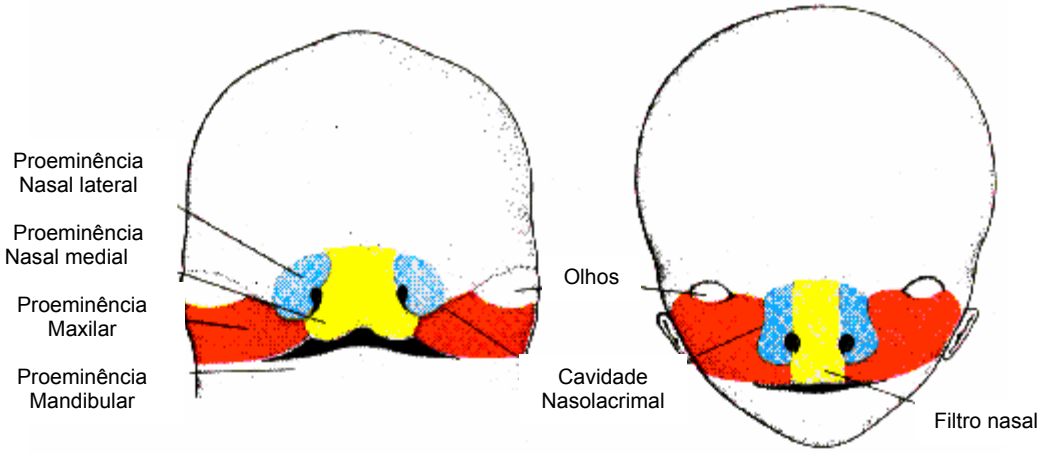


Figura 2.4: Esquema representativo das proeminências nasal medial (amarelo); nasal lateral (azul); maxilar (vermelho) e mandibular (Sulik et al., 2006)

Ao final da quarta semana, espessamentos ovalados se desenvolvem de cada lado no ectoderma da proeminência frontonasal, os quais recebem o nome de placóides nasais, conforme ilustrado na Figura 2.5, destacado em azul. Em seguida, ocorre uma rápida proliferação celular de ectomesênquima em torno dos placóides, tornando possível a formação das proeminências nasais laterais e mediais, representados na Figura 2.5 em amarelo. Já a Figura 2.6 destaca a proeminência nasal lateral (verde), a proeminência nasal medial (amarelo) e a proeminência maxilar (vermelho). Através da apoptose celular seletiva e proliferação dos tecidos, as fossetas ou fossas nasais são formadas e alojam os placóides nasais (Gorlin et al., 1990; Ten Cate, 1994 e Moore e Persaud, 1994).

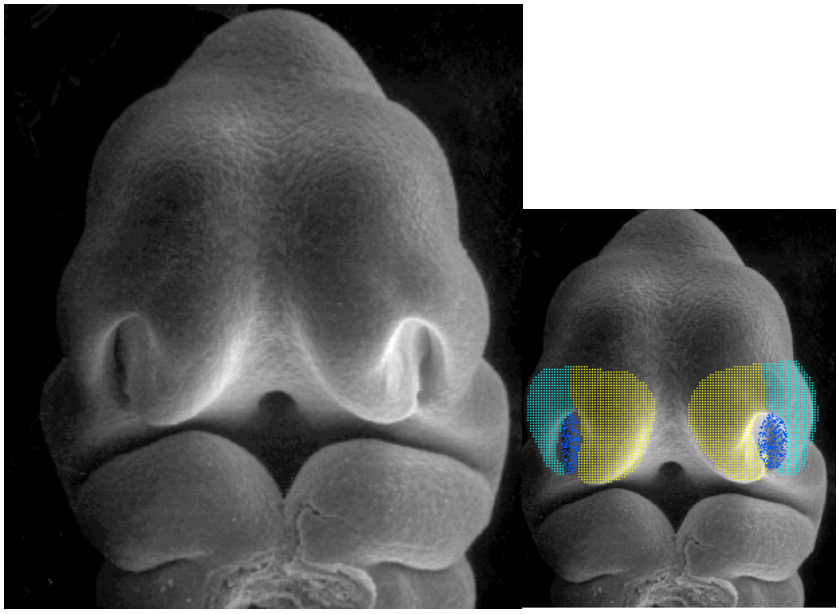


Figura 2.5: Placóides Nasais nasal lateral (verde), a proeminência nasal medial (amarelo) e (Sulik et al., 2006)

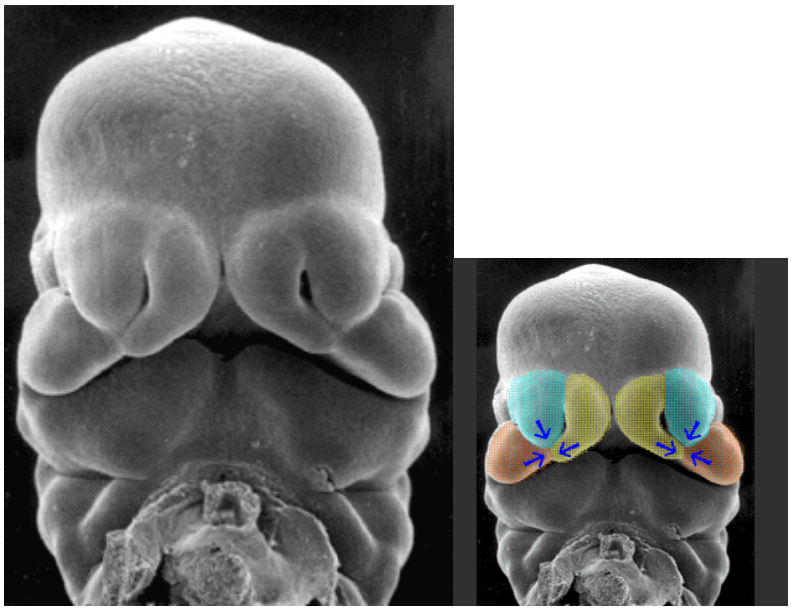


Figura 2.6: Proeminências Nasais (laterais-verde; mediais-amarela) e Maxilar (vermelha) (Sulik et al., 2006)

Os processos nasais mediais dos dois lados e o frontonasal formam a porção medial do nariz, a porção anterior da maxila e do palato primário. O lábio superior é formado pelos processos maxilares e nasais que vão crescendo em direção à linha mediana, onde se fundem. Dessa maneira, o processo frontonasal é deslocado,

deixando de ocupar a região do lábio superior. O lábio inferior é formado pela fusão dos dois processos mandibulares na linha mediana.

Quando os processos maxilares não se fundem na porção anterior, ficando entre eles os processos nasais mediais, forma-se uma fenda labial que pode ser uni ou bilateral. A fenda do tipo central, formada pela fusão incompleta dos processos nasais mediais, é de ocorrência rara (Katchuburian e Arana, 1999).

A formação do palato primário ocorre no final da 5ª. semana, como conseqüência da fusão das proeminências nasais média e maxilares. Ela está à parte do segmento intermaxilar, que também consiste da maxila anterior com os quatro dentes anteriores e o filtro do lábio superior (Fick e Marchioro, 1998).

O palato secundário se torna aparente pela sexta semana de desenvolvimento embrionário quando aparecem duas protuberâncias originadas das proeminências maxilares chamadas de processos palatais (primórdios palatinos laterais ou conchas palatais). Nesse período do desenvolvimento embrionário, a língua apresenta crescimento acelerado em direção à cavidade buconasal, quando preenche toda a cavidade oral e força os primórdios palatinos a crescer em posição vertical (Moore e Persaud, 1994). A Figura 2.7 apresenta um corte frontal no qual a língua está inicialmente interposta entre os processos palatinos secundários, ressaltados na menor ilustração em vermelho.

A Figura 2.8 ilustra que os processos palatinos ficam posicionados sobre a língua no momento da fusão do terço médio da face. Para melhor entendimento da figura, salienta-se a língua em vermelho e os processos palatinos em laranja.

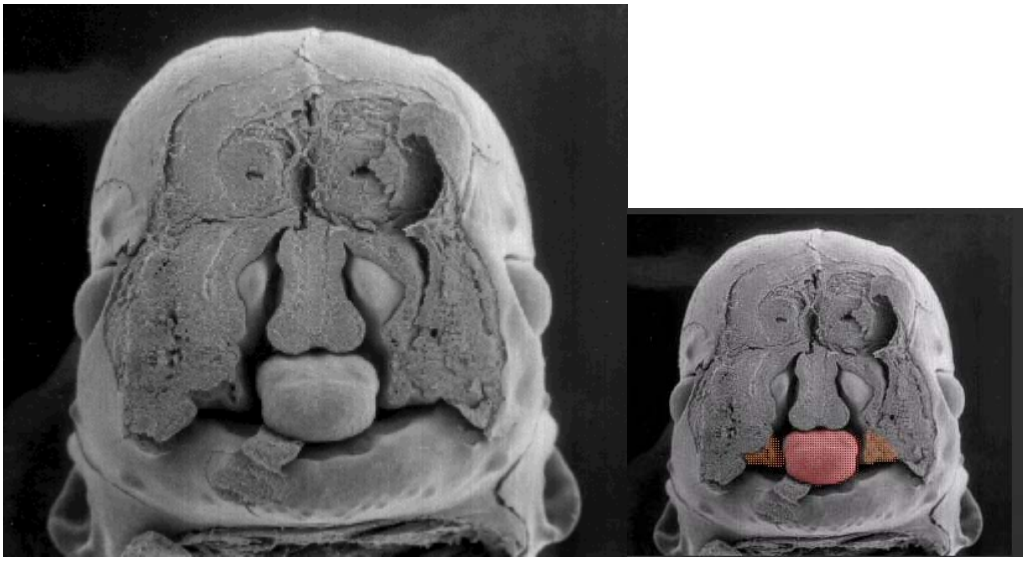


Figura 2.7: Língua (vermelho) Interposta entre os palatinos secundários (laranja) (Sulik et al., 2006)

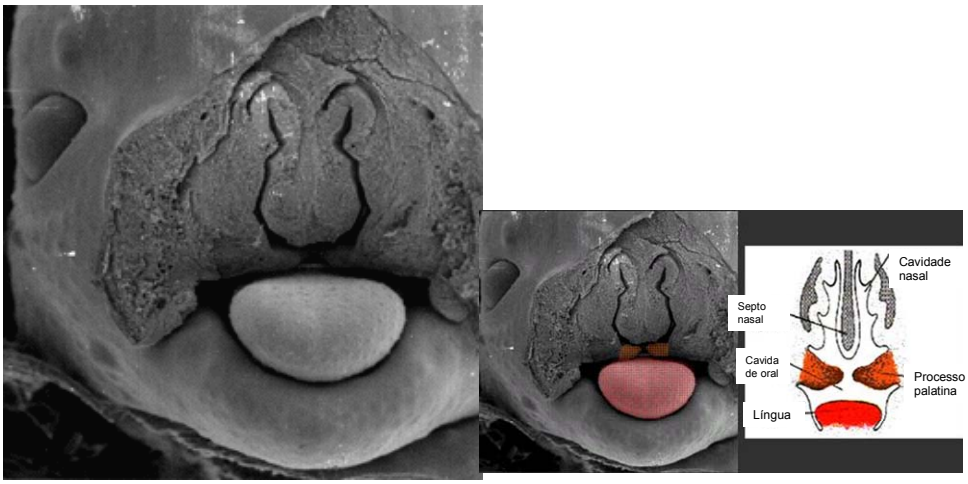


Figura 2.8: Fusão dos processos palatinos (laranja), acima da língua (vermelho) (Sulik et al., 2006)

Entre a sétima e a oitava semana de gestação, o desenvolvimento do palato secundário faz fusão medial das cristas mediais das cristas palatinas, em uma posição horizontal superior à língua, através de uma seqüência de eventos de morte celular programada que culmina nessa fusão entre elas e com o palato primário e septo nasal. Essa fusão continua em direção à úvula e promove o fechamento gradual e completo dos palatos duro e mole. A Figura 2.9 ilustra este processo, onde

os processos do palato secundário se aproximam um do outro próximo ao ponto central e fundem-se anteriormente e posteriormente deste ponto.

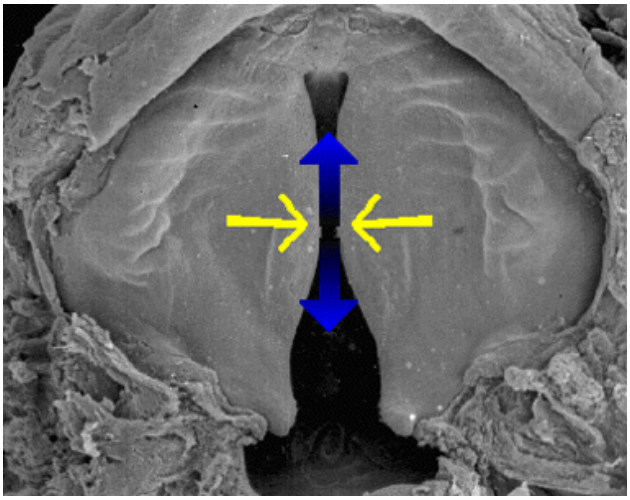


Figura 2.9: Fusão dos Processos do Palato Secundário (Sulik et al., 2006)

A horizontalização das conchas palatais é promovida pela chamada ˝força intrínseca das conchas palatais˝ e possui uma base bioquímica e fisioquímica bastante complexa (Gorlin *et al.,* 2001).

Estudos experimentais demonstram que a horizontalização dos primórdios palatinos requer uma complicada seqüência de eventos relacionados ao crescimento da língua, da mandíbula e da cabeça, que deve levar ao aparecimento de um espaço supra lingual adequado (Poerner, 200).

Falhas na sincronização dos movimentos e do crescimento das cristas palatinas e de elementos da língua, da mandíbula e da cabeça em geral, podem afetar o fechamento normal do palato (Katchburian e Arana, 1999).

Na sétima semana, os processos palatais, que inicialmente são direcionados em uma posição oblíqua e descendente de cada lado da língua, sobem acima da língua e se estendem horizontalmente a esta. Os processos se fundem formando os

palatos duro e mole, constituindo, assim, o palato primário. Este se funde anteriormente com o palato secundário.

O forame incisivo representa o marco da linha média entre os palatos primário e secundário. As fendas labiopalatinas resultam da fusão parcial ou ausência total de fusão da proeminência maxilar com a proeminência nasal média, em um ou ambos os lados anteriores ao forame incisivo e/ou resultam da falta de fusão posterior dos processos palatinos ao forame incisivo (Fick e Marchioro, 1998). Esta formação fica mais bem ilustrada através da Figura 2.10, onde o processo nasal mediano se encontra destacado em amarelo, os nasais laterais em verde e os maxilares em vermelho.

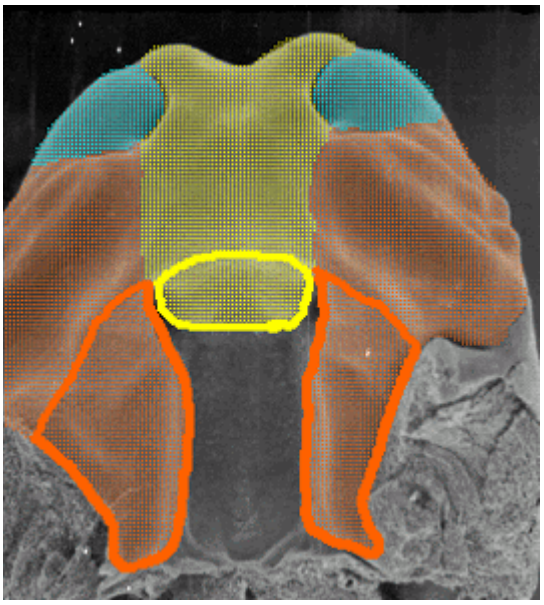


Figura 2.10: Processos nasais e maxilares (Sulik et al., 2006)

Quando o osso membranoso se desenvolve no palato primário, formando a parte pré-maxilar da maxila, porções dos ossos maxilares e palatino se direcionam para o interior dos processos palatinos laterais, formando o palato duro, conforme ilustrado na Figura 2.11, onde destaca-se a pré-maxilar em amarelo.

As porções posteriores dos processos palatinos laterais não se ossificam, mas se estendem para a região posterior do septo nasal e se fundem para constituir o palato mole e a úvula, que é a última porção do palato a se formar. A rafe palatina indica a linha de fusão dos processos palatinos. O fechamento do palato secundário depende de forças intrínsecas nos processos palatinos e do deslocamento da língua do espaço entre os processos palatinos, devido ao padrão de crescimento da cabeça (Gorlin et al., 1990 *apud* Martins, 2002; Moore e Persaud, 1994).

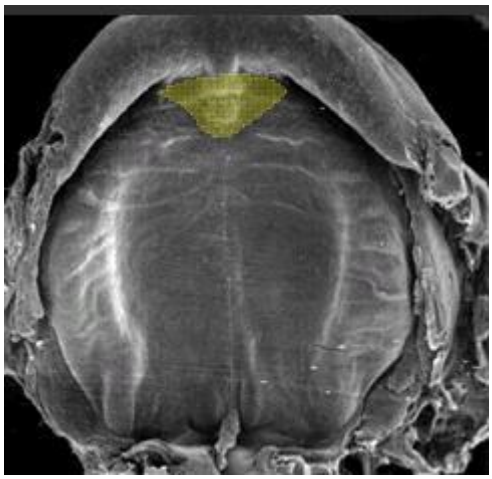


Figura 2.11: Pré-maxila (amarelo) (Sulik et al., 2006).

A fissura palatina é resultado do “fracasso” de fusão dos processos palatais, que fisiologicamente seguem a seqüência de crescimento vertical e posteriormente horizontal, fundindo-se durante a sexta e nona semana gestacional (Ghassibe, 2004).

O fechamento final do palato ocorre um pouco mais tarde nos embriões do sexo feminino (Gorlin et al., 2001), o que possivelmente determina as diferenças de freqüência encontradas nos tipos de fissura em pacientes de gêneros diferentes (Poerner, 2005).

O controle básico do desenvolvimento, tanto em magnitude quanto em época, é realizado por genes específicos, bem como o potencial de crescimento. O resultado final do crescimento depende da interação entre os fatores genéticos e os ambientais (Johnsen, 2004). Nas malformações faciais, que têm origem principalmente no primeiro arco branquial, esses fatores atuam durante a fase de histodiferenciação e morfogênese. Aproximadamente entre o 20º dia e a 12º semana do desenvolvimento embrionário, estes fatores podem inibir a migração das células derivadas da crista neural ou impedir a proliferação do mesênquima, tornando, assim, inadequado ou impossível o contato entre as proeminências. Ainda, o epitélio que recobre o mesênquima pode não sofrer apoptose e a fusão não ocorrer.

Quaisquer mudanças na posição dos placóides nasais, na direção do crescimento das proeminências maxilares e do segmento intermaxilar e a falta de união das proeminências maxilares às nasais mediais, pode distender o epitélio bucal e este, ao se romper, resultará em uma fissura labial.

Uma fissura palatina pode resultar da falha no crescimento das proeminências maxilares, inibindo a elevação dos processos palatinos e gerando um crescimento defeituoso destes, seja pela falta de fusão ou por uma ruptura após a fusão inicial (Ferguson, 1998 *apud* Martins, 2002; Moore e Persaud, 1994; Katchburian e Arana, 1999; Johnsen, 2004).

As fissuras faciais variam em grau de complexidade de acordo com a época do desenvolvimento em que ocorrem e com a duração das interferências que as originam (Rocha e Telles, 1990 *apud* Poerner, 2005).

2.2. Epidemiologia das Fissuras Labiopalatinas

Fissura lábio e/ou palato (FL/P) é um defeito comum do nascimento encontrado em mais de 300 síndromes conhecidas, mas pode ocorrer também como a única malformação e nestes casos é classificada como não-sindrômica (Gorlin et al, 1990; Gorlin et al., 2001).

Observa-se uma variação considerável da freqüência das FL/Ps em grupos étnicos distintos. São mais freqüentes entre índios americanos (3,6:1000), japoneses (2,1:1000) e chineses (1,4:1000) do que entre caucasianos (0,7-1,3:1000), e aparecem com menor freqüência entre negróides (0,3:1000) (Gorlin *et al*., 2001). Localização geográfica (Schutte e Murray, 1999 e Vanderas, 1987) e classe socioeconômica (Schutte e Murray, 1999 e Lidral et al, 1997) podem contribuir também com a variação da incidência das FL/Ps.

A Figura 2.12 apresenta o diagrama de vários tipos de fissuras FL/Ps. Na primeira ilustração tem-se a morfologia normal do lábio e palato; **a, e** representam a fissura unilateral e bilateral do palato mole isolado; **b, c** ilustram a fissura labial e vários graus de fissura labial e palatina envolvendo o palato duro (**c,g**) e palato mole (**d,g**) labiopalatina.

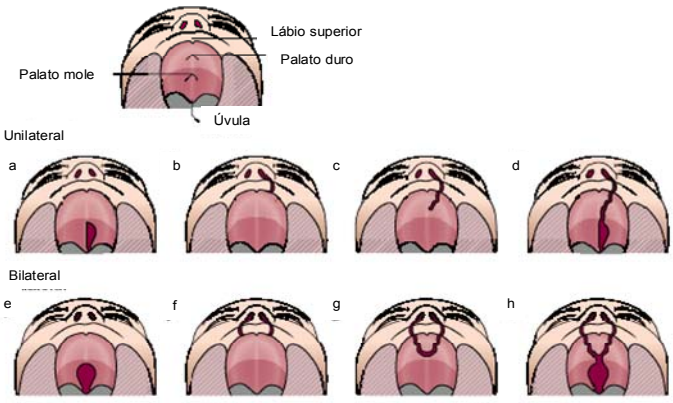


Figura 2.12: Tipos de fissura (Muenke,2002)

Aproximadamente 80% das fissuras são unilaterais e o lado esquerdo é o mais afetado em 70% dos casos. O palato está envolvido em 86% dos casos bilaterais e em 68% dos unilaterais (Tolarova, 1987; Lynch e Kimberling, 1981, Zhou, et al ,2006).

O sexo feminino é mais acometido pela fissura palatal isolada (FP), em uma proporção entre mulheres e homens de 1,5:1, respectivamente. O sexo masculino é mais comumente afetado pela fissura de lábio (FL/P), com ou sem envolvimento do palato, em uma proporção de 2:1 (homens para cada mulher). É importante ressaltar que as mulheres, em geral, apresentam as manifestações mais graves (Fogh-Andersen, 1967; Silva Filho e Ferrari, 1990 e Vieira et al., 2004, Zhou, et al 2006),).

No Brasil, a incidência de FL/P está em torno de 1:650 nascimentos vivos (Furlaneto, Robinson e Borges-Osório, 2003). No período de Janeiro de 1975 a Dezembro de), foram registrados no Brasil, 16.853 casos novos de fissura labiopalatina, tendo a região Sudeste contribuído com 61% deles. Desse total, nos últimos 20 anos, 4.413 se referiram à fissura isolada, sendo a maior proporção de fissuras labiopalatinas, totalizando 74% (Loffredo, Freitas, Grigolli, 2001).

Em uma amostra de pacientes, nascidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de 1983 a 1993, Collares et al. (1995) encontraram uma prevalência de 1/758 para FL/P, sendo 26% dos casos de FP, 14% de FL e 39% de FLP. Furlaneto e Pretto (2000), em um estudo epidemiológico com prontuários de 750 pacientes fissurados do então Serviço de Defeitos da Face da PUCRS (atualmente Centro Multidisciplinar de Atendimento de Portador de Fissura), encontraram que 96,3% dos indivíduos afetados eram da raça branca e 54,6% pertenciam ao gênero masculino. As fissuras labiais com ou sem envolvimento

palatino foram as mais freqüentes (84,45%), seguidas pelas fissuras palatinas isoladas (12,90%), sendo o lado esquerdo o mais afetado. Os mesmos autores encontraram maior número de fendas labiais com ou sem envolvimento palatino no gênero masculino, e predomínio do gênero feminino nas fissuras palatinas isoladas.

A Síndrome de Van der Woude (SVW) é a mais comum dentre as que podem manifestar fissura labial e/ou palatina, afetando 1 em cada 35.000-100.000 pessoas (≈1:70.000). Estima-se que aproximadamente 1-2% de pacientes com fissura lábio e/ou palatina têm SVW (Ghassibé, 2004).

2.3. Etiologia: Fissuras Labiopalatinas e Genética

Desde 1942 (Fogh-Anderson) têm sido desenvolvidas pesquisas na tentativa de se elucidar a etiologia das FL/P e das FP. Estas malformações constituem um grupo etiologicamente heterogêneo e estudos na área de genética, epidemiologia e embriologia sugerem que estas 2 (duas) malformações são etiologicamente distintas na grande maioria dos casos (Poerner, 2005)

As fissuras sindrômicas, que são aquelas associadas a outras alterações clínicas, estão relacionadas a mais de 350 desordens mendelianas (Muenke, 2002). Dentre estas, se destaca a síndrome de Van der Woude, que é uma condição de herança autossômica dominante e que difere das fissuras não sindrômicas apenas pela presença de *"pits*" (covas) (Muenke, 2002). Por outro lado, as fissuras lábio-palatinas ou fissuras palatinas não-sindrômicas (FLPNS ou FPNS), que são aquelas não associadas a outras malformações ou sinais clínicos, têm uma etiologia complexa.

As FLPNS e FPNS não se encaixam perfeitamente em nenhum modelo de herança mendeliana: de 50 a 75% dos casos são esporádicos e os casos familiais apresentam risco de recorrência diferente do esperado para os padrões de herança mendelina (Gorlin et al., 2001). Ao contrário do observado para os portadores da SVW que tem risco de 50% de virem a ter descendentes afetados, os portadores de FL/PNS ou FPNS têm risco baixo, estimado em aproximadamente 4% quando se trata de caso único na família, de virem a ter descendentes com esta malformação. Existem várias outras evidências da participação de fatores genéticos no aparecimento destas malformações (Poerner, 2005). Suportando essa premissa, as FL/P são consideradas, pela maioria dos autores, como distúrbios de herança multifatorial, com efeito limiar, em que fatores genéticos e ambientais desempenham papel importante na sua etiologia.

Essa expressão multifatorial com efeito limiar se refere à existência de um limiar genotípico - quantidade mínima de genes necessários para o desenvolvimento da anomalia em um ambiente considerado. Assim, aqueles indivíduos que possuem maior quantidade de alelos predisponentes para a doença associados a fatores ambientais adversos estão mais predispostos a ultrapassar aquele limiar e expressar o distúrbio (Mitchell et al., 2001; Lidral, 2002).

Embora a fissura tenha alguns tratamentos ainda na infância, estas podem resultar em significativa morbidade. Tem sido postulado que FL/PNS é caracterizada por grande variabilidade fenotípica e heterogeneidade genética, o que complica a identificação das causas genéticas.

Devido à complexidade da etiologia das fissuras lábio-palatino, acredita-se que há uma contribuição de vários genes na etiologia destas malformações (Poerner,

2005). Alguns genes do desenvolvimento embrionário têm sido testados com o objetivo de observar sua participação na etiologia dessas fissuras, tais como o *TGF-α* (*Transforming Growth Factor Alpha* - Fator de Crescimento Transformador Alfa), *o TGF-β* (*Transforming Growth Factor Beta* - Fator de Crescimento Transformador Beta), o *MSX1 (Muscle Segment Homeobox* - Segmento Muscular Homeobox), o *IRF-6* (*Interferon Regulatory Factor 6* - Fator Regulatório do Interferon 6*), o BCL3* (Célula do tipo B do linfoma) e o *RARA* (Receptor Alfa para Ácido Retinóico- *Retinoic Acid Receptor Alpha*) (Murray, 2002; Vieira e Orioli, 2001; Gaspar, 2002; Gaspar, 2004).

Há um esforço mundial na tentativa de se identificar tanto os fatores genéticos como ambientais que tenham um papel importante na ocorrência das FL/Ps e FPs. Certamente uma melhor compreensão dos mecanismos que levam à ocorrência destas malformações poderá contribuir para o estabelecimento de medidas preventivas das mesmas.

2.4. Fatores Reguladores de Interferon (IRFs)

Os Fatores Reguladores de Interferon (*IRF-Interferon Regulatory Factor*) formam uma família de fatores de transcrição que tem uma extensa homologia em sua seqüência de consenso de reconhecimento do DNA (*DNA-binding domain-DBD*) (Au, et al., 1995; Nguyen et al., 1998 e Li, et al., 1999). Os membros dessa família de reguladores transcricionais têm em comum a habilidade de se ligar a uma seqüência homóloga do gene do interferon-β e vários genes regulados pelo interferon. A principal função da família IRF é a regulação de respostas imunes, especialmente contra a infecção viral ou de ligação ao Interferon tipo I, resultando na amplificação do ataque antiviral e ativação da defesa adaptativa (Nehyna, 2002). A

resposta inata é a primeira linha de defesa contra uma infecção viral e envolve a produção de interferons (IFNs) e citocinas; ativação do sistema complemento e das células *natural killer cells-NKC*. Estes eventos estimulam a resposta imune adaptativa que habilita o reconhecimento de antígenos de alto grau na especificidade natural.

Em perspectiva à constatação de que a expressão e/ou função dos membros da família IRF são reguladas por citocinas imunomoduladoras e que alguns de seus membros são expressos seletivamente em linhagens de células hematopoiéticas, provavelmente eles participam na regulação do desenvolvimento e função do sistema imune, mais especificamente na atuação da resposta antiviral (Mamane et al., 1999). Atualmente já se conhecem nove membros dessa família, que incluem ICSBP, ISGF3g/p48, IRF1, IRF2, IRF4/LSIRF/Pip/ICSCAT, IRF5, IRF6, IRF7 e vIRF (Nguyen et al., 1998 e Li, et al., 1999). Dentre esses, os mais bem caracterizados são o IRF-1 e IRF-2, que foram originalmente identificados através dos estudos de regulação da transcrição do gene humano *IFN-β*. Respostas celulares complexas são freqüentemente coordenadas por uma rede regulatória genética, onde os fatores de transcrição controlam a expressão de diversos genes alvos. O IRF1 e IRF2 foram originalmente identificados como ativadores e repressores do Interferon-β (IFN-β), bem como, indutores de genes IFN. Entretanto, estes fatores foram mostrados não só como moduladores da resposta celular dos IFN, mas, como também, atuam no crescimento celular, oncogênese, indução de apoptose e ativação de células T na resposta imune. Além disso, evidências sugerem que a inativação e/ou deleção do gene *IRF-1* possa ser uma etapa crítica no desenvolvimento de alguns neoplasmas hematológica humanos (Vaughan et al., 1997; Nguyen et al., 1998).

O IRF5, outro membro da família tem estrutura bastante semelhante ao IRF6 e sua expressão é induzida pela estimulação dos IFNα/β (Taniguchi, et al.,2001).

As pesquisas revelam que cada membro dessa família mostra um papel distinto em processos biológicos, como nas respostas imunológicas a patogenias, sinalização de citocinas, regulação do crescimento das células e desenvolvimento hematopoiético (Nguyen et al., 1998).

Os Interferons (IFNs) formam uma família de citocinas envolvidas na resposta celular antiviral que têm um papel importante no crescimento celular e diferenciação (Vaughan et al., 1997).. O IFN é um indutor importante dos genes *IRFs*, MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) e de gene que regula a síntase do óxido nítrico. Alguns IRFs são ativados diretamente através de estímulos dos antígenos ou por estímulo de proliferação. As funções dos fatores de transcrição IRF durante a resposta antiviral são amplas, envolvendo também diferenciação, proliferação e apoptose das células do sistema imune. Defeitos nesse sistema de regulação levam ao desenvolvimento de tumores, como comprovado pela associação de câncer com o defeito na expressão dos *IRF1* ou *IRF8*, com mutações do *IRF2* e com a superexpressão do *IRF4* (Nehyna, 2002).

Estruturalmente, os diferentes IRFs possuem em comum um domínio hélice-alça-hélice de ligação ao DNA (Taniguchi, et al., 2001 e Nehyna, 2002). Uma intensiva análise funcional tem sido realizada sobre o *IRF1*, revelando uma extraordinária diversidade de funções sobre os fatores de transcrição e na regulação da resposta imune celular (Taniguchi, et al., 2001). A atividade do IRF é regulada em parte por modificações pós-traducionais e subseqüente interação entre os membros da família IRF (Nguyen et al., 1998). A compreensão dos mecanismos moleculares

pelos quais os IRFs afetam estes eventos celulares (quais!!!! Colocar?) e a expressão de IFN poderia contribuir para uma melhor compreensão de eventos imunes, oncogênicos e embriológicos, auxiliando na determinação de possíveis estratégias terapêuticas futuras (Nguyen et al., 1998; Mamane et al., 1999 e Taniguchi, et al., 2001).

2.5. IRF6 (Fator Regulador de Interferon-6)

A exata função do *IRF6* ainda é desconhecida, com estudos que sugerem um importante papel na cascata de eventos de transdução intracelular do *TGF-β* (Nehyna, 2002 ; Srichomthong, Siriwan e Shotelersuk, 2005). Recentemente foi demonstrado que mutações no gene *IRF6* podem estar relacionadas à síndrome de Van de Woude, sugerido pela primeira vez a importância deste gene na formação do lábio e palato (Kondo et al., 2002).

O *IRF6* consiste de 9 (nove) exons e pertence a uma família de fatores de transcrição que têm um domínio de ligação com DNA altamente conservado hélice-alça-hélice, codificado pelos exons 3 e 4, e um domínio de ligação com proteína, codificado pelos exons 7 e 8, chamado SMIR (*Smad-interferon regulatory factor–binding domain*) ou domínio de ligação SMAD-IRF (Kondo, et al, 2002; Nehyna, 2002). O autor Ghassibé (2004) relata que o *IRF6* possui 10 (dez) exons, o primeiro e o último não-codificantes.

A expressão do *IRF6* tem sido estudada em ratos (Kondo et al., 2002). Através da análise da transcrição do DNA, essa expressão do *IRF6* foi verificada, nesses ratos, nos seus tecidos embrionários: nas proeminências medianas do palato, germe dentário, tubo tireoglosso folículo capilar, pele e órgão genital externo, como também em tecidos adultos (Nehyba, 2002 e Ben et al., 2005).

Em embriões de *Xenopus* o *IRF6* é expresso inicialmente na transcrição materna e depois nos somitos posteriores do mesoderma e do estágio de tubo neural embrionário (Hatada *et al*., 1997).

O *IRF6* é necessário para a morfogênese normal da camada de revestimento epitelial das estruturas embrionárias na fase de clivagem e blástula (Ben et al., 2005). Nehyba (2002) descreveu a atuação do *IRF6* nas diversas fases de formação do embrião. Durante a fase de gastrulação a expressão do *IRF6* fica concentrada em células predecessoras (*forerunner cells*). Na fase de broto para fase de 3 (três) somitos, ele foi expresso na vesícula de Kupffer. Nenhuma expressão foi observada nas fases 6 (seis) e 10 (dez) somitos. Na de 14 (quartoze) somitos, sua expressão foi descoberta no placóide auricular. Na fase de 17(dezessete) somitos, apresentou-se fortemente expresso na região de cloaca. Da fase faríngula até o período laval de 5 (cinco) dias pós-fertilização, apresenta o *IRF6* expresso nos arcos faríngeo, olfatório e placóide auricular nas células do epitélio derivado do tecido endodermal. Os tecidos posteriores incluem a boca, faringe, esôfago, fígado, pâncreas e seus ductos associados.

2.6. IRF6, Síndrome de Van der Woude (SVW), FLPNS e FPNS

A Síndrome de Van der Woude (SVW, OMIM # 119300) é autossômica dominante, caracterizada pela presença de fissura labial com ou sem envolvimento de palato (FL/P), fenda palatina isolada (FP), covas ("*pits*") na mucosa externa do lábio inferior e hipodontia (Figura 2.13) (Kayano, 2003, Matsuzawa, et al., 2004 e Wong e Hagg, 2004). É a forma mais comum entre as fissuras sindrômicas. Observa-se que 15 a 50% dos casos de SVW são indistinguíveis das FL/P não-

sindrômicas (Zucchero et al, 2004). Por outro lado, estima-se que 2% dos casos de FL/P não-sindrômicos, correspondam a casos de SVW (Gorlin et al., 2001).

Há uma grande variabilidade do quadro clínico na SVW, mesmo entre indivíduos pertencentes à mesma família. Aproximadamente 25% dos indivíduos com a síndrome têm algum sinal, mesmo que mínimo, como apenas defeitos dentários, a fissura lábio-palatina está presente em aproximadamente 50% dos casos. As covas em lábio são as características principais desta síndrome, presentes em 70-80% dos portadores. Normalmente, no fundo dessas covas, existe uma associação com glândulas salivares acessórias, causando, às vezes, extravasamento visível de saliva ao meio externo labial (Matsuzawa, 2004; Ghassibe, 2004). Os mecanismos responsáveis pela variabilidade clínica são ainda desconhecidos e tem-se sugerido a existência de genes modificadores para explicar a expressividade variável da síndrome.

A doença apresenta alta penetrância (96,7%) e expressividade muito variável, observando-se pacientes que apresentam apenas discretas covas nas comissuras labiais, até aqueles que, além dessas covas labiais, apresentam fissuras bilaterais de lábio e palato completas (Janku *et al*., 1980; Kondo *et al*.,2002; Kayano, 2003). A prevalência da SVW varia de acordo com a população estudada de 1:40.000 até 1:100.000 nascimentos (Rintala e Ranta, 1981; Burdick, 1986; Gorlin *et al*., 1990; Shotelersuk, 2003).

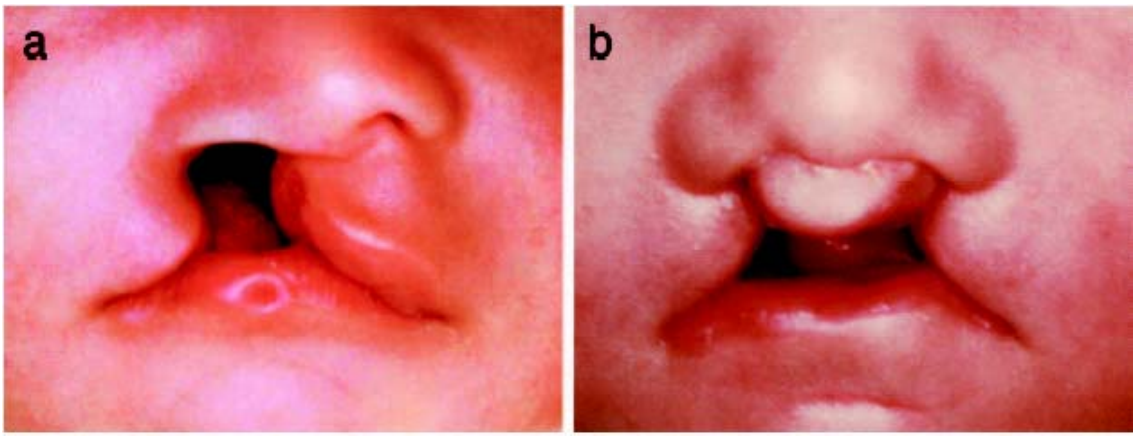


Figura 2.13: Síndrome de Van der Woude (SVW, OMIM # 119300), (a) FLP com covas no lábio inferior; (b) FLP bilateral (Matsuzawa, 2004)

As pesquisas sobre o gene relacionado com SVW foram realizadas seguindo as estratégias tradicionais de análise de ligação e clonagem posicional, que levaram ao mapeamento dessa síndrome no cromossomo 1q32-q41. Um mapeamento mais detalhado da região crítica para a SVW culminou com restrição de uma região genômica de 350kb no intervalo compreendido entre mais de 20 genes candidatos (Matsuzawa, 2004).

O estudo de um par de gêmeos monozigóticos discordantes no diagnóstico permitiu a identificação do gene *IRF6* na etiologia da SVW. Uma mutação *nonsense* em *IRF6* no gêmeo portador e não presente em seu irmão ou pais foi o primeiro passo para essa descoberta, e posteriormente, foram achadas mais 70 mutações adicionais (Tabela 2.1) em outras famílias SVW (Kondo et al., 2002; Ye, et al, 2005). A maioria das mutações patogênicas é do tipo *nonsense* (código de parada prematuro) ou *missense* (troca de sentido). Estas mutações podem levar à perda de função da proteína.

Tabela 2.1: Mutações em *IRF6* (Kondo, et al., 2002).

Family	Mutation	nt change	aa change	Exon
VWS1	frameshift	A–48T	5'UTR to Met	2
VWS2	frameshift	G3A	Met1Ile	3
VWS3	missense	C5T	Ala2Val	3
VWS4	frameshift	17ins(C)	Arg6fs	3
VWS35	frameshift	49del (CAGGTGGATAGTGGCC)	Gln17fs	3
VWS5	missense	G52A	Val18Met	3
VWS36	missense	T53C	Val18Ala	3
VWS37	nonsense	C69A	Tyr23X	3
VWS6	missense	C115G	Pro39Ala	3
PPS1	missense	T178G	Trp60Gly	4
VWS7	missense	C182G	Ala61Gly	4
PPS2	missense	A197C	Lys66Thr	4
VWS8	nonsense	C202T	Gln68X	4
VWS9	nonsense	C202T	Gln68X	4
VWS10	missense	G208C	Gly70Arg	4
VWS11	missense	G208C	Gly70Arg	4
VWS45	missense	C226T	Pro76Ser	4
PPS13	missense	C244A	Gln82Lys	4
PPS3	missense	C250T	Arg84Cys	4
PPS4	missense	C250T	Arg84Cys	4
PPS5	missense	C250T	Arg84Cys	4
PPS6	missense	C250T	Arg84Cys	4
PPS7	missense	C250T	Arg84Cys	4
PPS8	missense	G251A	Arg84His	4
PPS9	missense	G251A	Arg84His	4
VWS12	missense	A262C	Asn88His	4
PPS10	missense	A265G	Lys89Glu	4
VWS13	missense	A268G	Ser90Gly	4
VWS14	nonsense	G274T	Glu92X	4
VWS41	nonsense	G274T	Glu92X	4
VWS15	missense	G292C	Asp98His	4
VWS16	nonsense	C352T	Gln118X	4
VWS17	frameshift	466ins(C)	His156fs	5
VWS18	nonsense	C558A	Cys186X	6
VWS19	nonsense	G576A	Trp192X	6
VWS20	frameshift	634in(CCAC)	Ser212fs	6
VWS21	frameshift	657del (CTCTCTCC)ins(TA)	Ser219fs	6
VWS42	frameshift	744del(CTGCC)	Gly248fs	7
VWS22	missense	G749A	Arg250Gln	7
VWS43	nonsense	T759A	Tyr253X	7
VWS44	frameshift	795del(C)	Leu265fs	7
VWS23	missense	A818G	Gln273Arg	7
VWS24	frameshift	842del(A)	His281fs	7
VWS25	deletion	870del (CACTAGCAAGCTGCTGGAC)ins(A)	FTSKLLD290L	7
VWS46	missense	T881C	Leu294Pro	7
VWS26	missense	G889A	Val297Ile	7
VWS38	missense	A958G	Lys320Glu	7
VWS39	missense	A958G	Lys320Glu	7
VWS27	missense	G961A	Val321Met	7
VWS40	missense	G974A	Gly325Glu	7
VWS28	missense	T1034C	Leu345Pro	7
VWS29	missense	G1040T	Cys347Phe	7
VWS30	missense	T1106C	Phe369Ser	8
VWS31	missense	C1122G	Cys374Trp	8
VWS32	missense	A1162G	Lys388Glu	8
PPS11	nonsense	C1177T	Gln393X	8
VWS33	nonsense	C1234T	Arg412X	9
PPS12	missense	G1288A	Asp430Asn	9
VWS34	frameshift	1381ins(C)	Pro461fs	9

Nucleotide position is relative to start codon. Mutations in the DNA-binding and SMIR/IAD domains are located in the top and bottom box, respectively.

As mutações que se acumulam tanto no domínio de ligação com o DNA quanto no domínio SMIR, podem levar a perda de função da proteína (Figura 2.14). Portanto, têm-se sugerido que a síndrome é decorrente de um mecanismo de haploinsuficiência (Kondo et al., 2002). A haploinsuficiência se dá pela perda da função proteína no caso de mutações que introduzem um códon de parada prematura (*stop codon*) ou pela incapacidade desta de ligar ao DNA ou a outras proteínas (Oliveira, 2006).

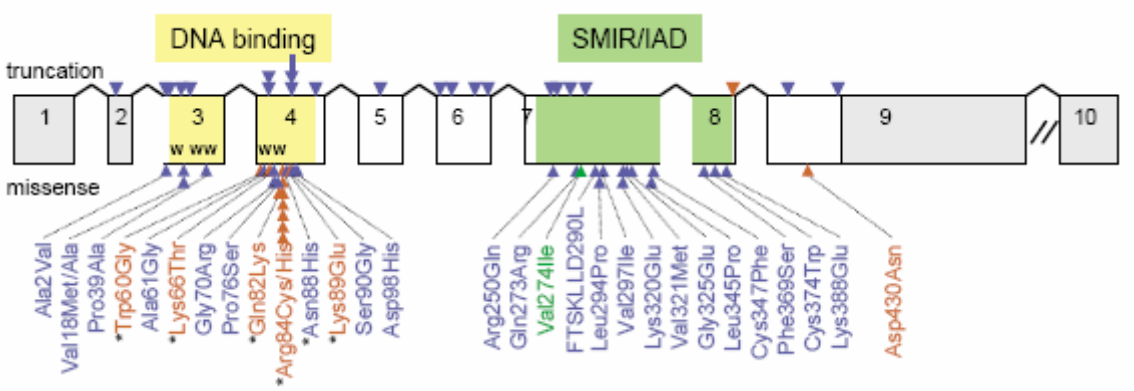


Figura 2.14: Distribuição das mutações presentes nos exons do gene *IRF6* (Kondo et al., 2002).

Dada a semelhança do quadro clínico entre SVW e FLPNS ou FPNS, levantou-se a hipótese de que mutações polimórficas no gene *IRF6* poderiam estar associadas com a predisposição as FLPNS.

Alterações no *IRF6* são as causas genéticas conhecidas mais comuns nos defeitos congênitos de FL/P (Srichomthong, Siriwan e Shotelersuk, 2005). Zucchero et al (2004) mostrou evidência de associação entre um polimorfismo de base única (SNP) no gene *IRF6* e FL/PNS, onde um dos alelos (IRF6 820G) confere um risco de 11.6% de um indivíduo desenvolver FL/PNS em uma população de Filipinos. Srichomthong, Siriwan e Shotelersuk (2005), observaram resultados semelhantes

nas populações Tailandesas, onde o risco do alelo G do *IRF6* (IRF6 820G) para FL/PNS é de 16.69%. Embora o *IRF6* 820G seja muito raro ou ausente entre os europeus (inibindo a estimativa do risco atribuível ao polimorfismo), estudos recentes nas populações italiana e da América do Sul mostraram uma forte evidência de desequilíbrio de ligação entre polimorfismos nos locos do *IRF6* e FL/PNS (Blanton et al., 2005). Estes achados sugerem que o *IRF6* tem uma importante contribuição na etiologia de FL/PNS em várias populações.

Talvez a variante de sucessão mais intrigante em *IRF6* seja a substituição de uma isoleucina por um resíduo de valina evolutivamente conservado no códon 274, no domínio de ligação à proteína (domínio de ligação do fator regulatório de *smad-interferon*) Esta variante foi achada em pacientes com SVW, em 3% dos caucasianos e 22% de asiáticos (Muenke, 2002; Srichomthong, Siriwan e Shotelersuk, 2005).

O gene *IRF6* está envolvido no desenvolvimento embriológico do lábio, palato, pele e genitália externa, mas sua forma de ação e seu gene alvo ainda não foram esclarecidos. Como, também, a associação entre as mutações no *IRF6* e a SVW. Análises dessas mutações, em animais, revelaram que *MSX1* e *TGF -β* desempenham papéis importantes no desenvolvimento do lábio e do palato. Além disso, essas moléculas podem ser genes alvos regulados pelo *IRF6*. Alternativamente, a sinalização transduzida por *MSX1* e *TGF-β* pode regular a expressão do *IRF6* (Matsuzawa, 2004). Segundo os autores Muenke (2002), Matsuzawa (2004), Ben *et al*, (2005), é provável que substituições de aminoácidos nas estruturas conservadas do *IRF6* (porção N-terminal e domínio de ligação ao DNA, hélice-alça-hélice), possam abolir a capacidade de ligação e reconhecimento ao DNA, ligação a outras proteínas ou mesmo deleção desse gene, que resulta em

haploinsuficiência, com isso afetando o desenvolvimento craniofacial. Kondo et al., 2002, não identificaram mutação patogênica em uma proporção de casos com SVW, após terem seqüenciado o gene *IRF6* dessa amostra de DNA destes pacientes. Estes resultados reforçam a existência de heterogeneidade não alélica em SVW ou, alternativamente, a presença de mutações que não são detectadas pelas técnicas convencionais de análise de sequenciamento de exons e de introns flanqueadores. Tais mutações poderiam ser mudanças de nucleotídeos em regiões promotoras ou intrônicas, deleção, duplicação ou rearranjo (Kayano, 2003). Pesquisas identificaram uma grande deleção no cromossomo 1q32-q41 em uma criança com SVW. Microdeleção cromossômica também foi identificada como causa de SVW em um grupo de pacientes (Kayano, 2003).

Apesar do fato de que polimorfismos do *IRF6* podem estar relacionados ao aumento da ocorrência de FLPNS, estima-se que 2% dos casos sejam causados por mutações patogênicas no gene *IRF6*, representando, portanto, pacientes com SVW. Contudo, até o presente momento, não há nenhum estudo que tenha avaliado esta hipótese numa população brasileira.

Assim sendo, o presente trabalho tem como objetivo principal verificar qual a proporção dos pacientes com FLPNS portadores de mutação patogênica no gene IRF6. A identificação destes casos poderia possibilitar a realização de um aconselhamento genético mais preciso bem como avaliar a importância de se oferecer este teste nos casos de FLPNS.

3. HIPÓTESE

Uma parcela dos pacientes clinicamente diagnosticados com fissura lábio-palatino não-sindrômica (FL/PNS) são portadores da Síndrome de Van der Woude (SVW) causada por mutações no gene *IRF6.*

4. PROPOSIÇÃO

Verificar a freqüência de casos clinicamente diagnosticados como FL/P não-sindrômicas (FL/PNS) que apresentam mutação patogênica no gene *IRF6*, o que representaria casos com a Síndrome de Van der Woude (SVW) em uma amostragem de população brasileira com fenda.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Aspectos Éticos

Este projeto foi apresentado para aprovação nas Comissões Científicas e pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de São Paulo (USP) e Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), nos CEP da Faculdade de Odontologia (FOPUCRS) e do Hospital São Lucas (HSLPUCRS). Este estudo foi conduzido segundo (a) as Diretrizes e Normas Regulamentadoras Internacionais de Pesquisa envolvendo Seres Humanos - Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e (b) Declaração Internacional sobre os Dados Genéticos Humanos - UNESCO de outubro de 2003; (c) Resolução 340 de 8 de julho de 2004 do Conselho Nacional de Saúde. Foram selecionados apenas aqueles pacientes (ou seus responsáveis) que consentiram em participar da pesquisa, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

5.2. Amostra e Seqüências Alvo do Estudo

Foram selecionadas amostras de DNA genômico, que já extraídos de células da mucosa bucal ou de células sanguíneas de pacientes com fissura lábio-palatina clinicamente não-sindrômica, do banco de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da USP. As amostras de DNA foram quantificadas usando 5 µl de DNA diluídos em 495 µl de H_2O Milliq, através de espectometria (*Spectrometer-Ultrospec 3000 pro*®). Foram analisados os exons 3, 4 e 7 do gene *IRF6*- Fator de Regulação de Interferon 6 (*Interferon Regulatory Factor* 6) (Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3), o quais apresentam cerca de ~70% das mutações patogênicas que ocasionam a Síndrome de Van de Woude (Kondo et al., 2002).

5.2.1. Amplificação dos exons de interesse

Para a amplificação das seqüências de interesse dos exons 3, 4 e 7 foi utilizada a tecnologia de reação em cadeia da polimerase ("*Polymerase Chain Reaction*", PCR) em termociclador (*GeneAmp-PCR Sytem 9700-PE Appllied Biosytems*®), no qual o tamanho em pares de base de cada exon é: exon 3 com 373pb, exon 4 com 523pb e exon7 de 597pb. O método de PCR permite a amplificação *in vitro* de seqüências específicas de DNA, utilizando a enzima DNA polimerase, os quatro nucleotídeos e um par de *primers*[1] em fitas de DNA complementares (Saiki *et al,* 1985).

Os *primers* são usados para direcionar a síntese de DNA em ciclos repetidos. Em cada ciclo, ambas as fitas servem como moldes para a formação de fitas novas, obtendo-se assim um aumento exponencial do produto. Desta forma, tem sido permitido o estudo de seqüências de interesse pelos métodos convencionais de análise de DNA.

A fim de circunscrever a amplificação à área alvo de análise, primers específicos flanqueando os exons de interesse e/ou eventualmente anelando a introns flanqueadores foram utilizados (Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3). Foi realizada a padronização das técnicas de PCR e o sequenciamento com pacientes controles tanto para amostras de sangue, quanto para amostras de mucosa bucal.

---

[1] Primer: oligonucleotídeo curto, geralmente de 15 a 25 nucleotídeos de comprimento, que se pareia especificamente com uma seqüência-alvo para permitir que uma enzima polimerase inicie a síntese de uma fita de DNA complementar. Também chamado iniciador.

Figura 5.1: Seqüência de bases do amplicon do exon 3 do gene IRF6

Amplicon exon 3
Agctctagtagatgggaaaggtggctgggaagggttcccagtggctggcctaattcttctgctcttcccatttctccctctgaccccccag
ATCATGGCCCTCCACCCCGAGAGTCCGGCTAAAGCCCTGGCTGGTGGCCCAGGTGGATAG
TGGCCTCTACCCTGGGCTCATCTGGCTACACAGGGACTCTAAACGCTTCCAGATTCCCTGGA
AACATGCCACCCGGCATAGCCCTCAACAAGAAGAGGAAAATACCATTTTTAAACGCTTCCAGA
TTCCCTGGAAACATGCCACCCGGCATAGCCCTCAACAAGAAGAGGAAAATACCATTTTTAAGG
Taaaggacttcttctaccatcagacctttctgg

* Bases destacadas: seqüências dos primers F (foward) e R (reverse) que estão sendo utilizados.
**Letras minúsculas representam introns

Figura 5.2: Seqüência de bases do amplicon do exon 4 do gene IRF6

Amplicon exon 4
gtgtctatgagaaagggtaagcacATGCTTTGCAGTGGCTCTGGGCAATGATAGGACTCACT
GTGGTTTCTTGTT**C**TCAGGCCTGGGCTGTAGAGACAGGGAAGTACCAGGAAGGGGTGGATGA
CCCTGACCCAGCTAAATGGAAGGCCCAGCTGCGCTGTGCTCTCAATAAGAGCAGAGAATTCA
ACCTGATGTATGATGGCACCAAGGAGGTGCCCATGAACCCAGTGAAGATATATCAAGTGTGT
GACATCCCTCAGCCCCAGGGCTCGATCATTAACCCAGGTGAGGCCCCAGGTGCTGGGGAGAA
GGTGGGCAGCATGCCAGATTCTGGGCTGCACTCTTAAGAGATAGTCAACTTGAAAACAGCCT
GATTTACACAGTTTAAGATGGATAAAGCAAGAAAGCCTTTCTCTGGGAAGGACCCAGAAAAC
AAAAGATGCAGACTCAGCAAAATCTTGCTTACTTAGGGGAATGTTTTTTAACCTGGTTACTT
AAAgcattagaaagtggaggggtatac

* Bases destacadas: seqüências dos primers F (foward) e R (reverse) que estão sendo utilizados.
**Letras minúsculas representam introns

Figura 5.3: *Seqüência de bases do amplicon do exon 7 do gene IRF6*

Amplicon exon 7
Cttcctgaatgctggttgaaaggtggcttgatcttaatggacttgcatgagtcacagggatgaacaggcagagcagtgaagcaggactctc
actgtcatctctaaccttgcagTGACTGACCTGGACATCAAGTTTCAGTACCGTGGGAAGGAGTACGGGC
AGACCATGACCGTGAGCAACCCTCAGGGCTGCCGACTCTTCTATGGGGACCTGGGTCCCATG
CCTGACCAGGAGGAGCTCTTTGGTCCCGTCAGCCTGGAGCAGGTCAAATTCCCAGGTCCTGA
GCATATTACCAATGAGAAGCAGAAGCTGTTCACTAGCAAGCTGCTGGACGTCATGGACAGAGG
ACTGATCCTGGAGGTCAGCCGGTCATGCCATTTATGCCATCAGGCTGTGCCAGTGCAAGGTGT
ACGGTCTGGGCCATGTGCCCCATCACTTGTTGCTCCCAACCTGATTGAGAGACAAAAGAAGGT
CAAGCTATTTTGTCTGGAAACATTCCTTAGCGGtaagtcatttctcagaaagttgatcgtgggaatcactctctggaa
gtacattccttccactatccctgtctttcaccttcctgctttcct

* Bases destacadas: seqüências dos primers F (foward) e R (reverse) que estão sendo utilizados.
**Letras minúsculas representam introns

As condições gerais de PCR dos DNAs amplificados neste trabalho seguem o protocolo padrão abaixo descrito.

Reagentes necessários à amplificação foram misturados em um microtubo de troca térmica (200 μl) seguindo concentrações finais específicas otimizadas, conforme a Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Concentração final dos componentes da reação de PCR.

	Concentração final
10XPCR buffer	1X
dNTP´s (2,5mM)	0,20mM
Primers F e R (20μM)	0,8 μM
Taq polimerase (5U/μl)	1U/μMl
DNA molde	50-100ng

As misturas foram então transferidas ao termociclador e o seguinte protocolo de amplificação foi utilizado:

4' - 94ºC
30'' - 94ºC
30'' - 60ºC } 35X
1'30'' - 72ºC
15' - 72ºC
∝ - 4 ºC

Além deste protocolo, foi utilizado o programa de otimização adicional chamado "*touch down PCR*": as condições ótimas de anelamento para os exons 3 e 4 foram 63°C e do exon 7 de 62°C; empregando essa técnica a temperatura inicial para todos esses exons foi estabelecida a 69°C sendo então submetida a decréscimos de 0,5°C por ciclo até a temperatura de anelamento específica de cada exon. Isso foi feito durante 15 ciclos para os exons 3 e 4 e 14 ciclos para o exon 7, até chegar na temperatura específica de anelamento seguindo-se dos ciclos restantes, no total de 35 ciclos finais totais. Cada corrida consistiu de 1 (um) ciclo de 5 min de desnaturação a 95ºC; seguido de 45 seg a 94ºC – 45 seg a 69°C – 45 seg a 72°C, até chegar a temperatura de anelamento (15 ou 14 ciclos); 94°C por 45 seg – 62 ou 63°C (temperatura de anelamento) - 72°C por 45 seg; 72°C por 10min e 10°C ∞.

Os exons amplificados do *IRF6* foram analisados como produtos de PCR em 2 μl de PCR produto-amostra com 2μl de BFB ("*Bromophenol Blue*"), em gel de

agarose a 1,5%. O gel foi preparado utilizando 6 ml de tampão TBE 10x (89 mM ácido bórico, 1.2 mM de EDTA, pH 8.0), completando com água destilada até 60 ml e 0,9 g de agarose.

As amostras de DNA e tampão foram transferidas para o gel e submetidas à eletroforese a 120 V por 30-40 min. Após checagem da amplificação no gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio a 5% diluído em TBE, a imagem do gel foi exposta à luz ultra-violeta (UV), foi visualizada e fotografada (*Pharmacia Biotech FujiFilm-Thermal Imaging System-FTI 500*®). Só foram utilizados os produtos de PCR que apresentaram uma banda consistente depois de corados com Brometo de Etídeo (Figuras 5.1 e 5.2).

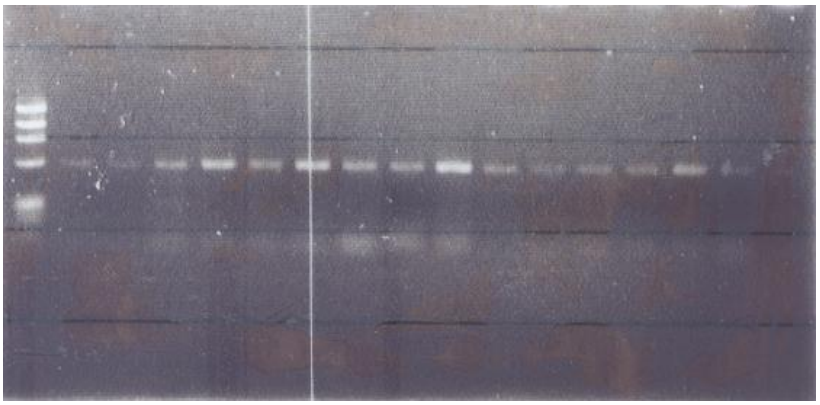


Figura 5.1: Check-gel do produto de PCR do exon 7.

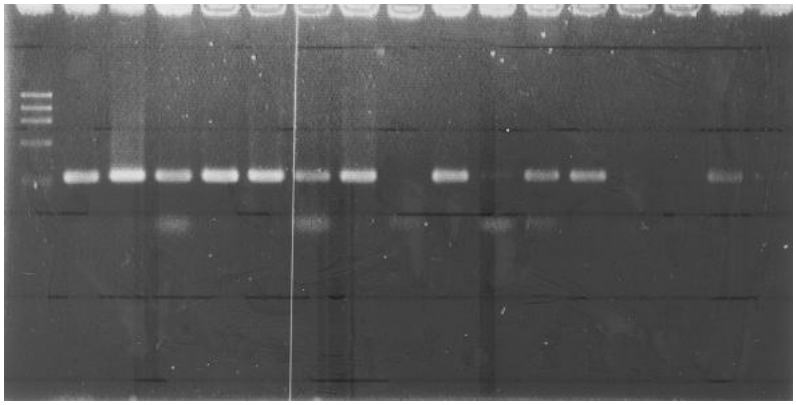


Figura 5.2: Check-gel do produto de PCR do exon 3.

5.2.2. Amplificação dos DNA degradados

Algumas amostras mais antigas de DNA extraído de células bucais (bochechos) mostraram-se degradadas na verificação de bandas em gel de agarose 1,5%, após técnica de PCR. A fim de tentar resgatar a informação contida nesses DNAs, foi seguido o seguinte protocolo do *Genomi Phi TM DNA Amplification kit* ®:

1- Desnaturação do DNA

- Mix (1) com 1µl de DNA com 9µl de *Sample Buffer*, aquecemento a 95°C por 3 min, em seguida resfriamento a 4°C(gelo);

2- Preparação para reação de amplificação

- Mix (2) com 9µl de *Reaction Buffer*, mais 1µl de enzima, realizando esse processo no gelo. Adicionando esse mix (2) no (1);

3- Incubar a 30°C por 16-18horas;

4- Após a amplificação, aquecimento da amostra a 65°C por 10 min, em seguida resfriamento a 4°C. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5% (Figura 5.3).

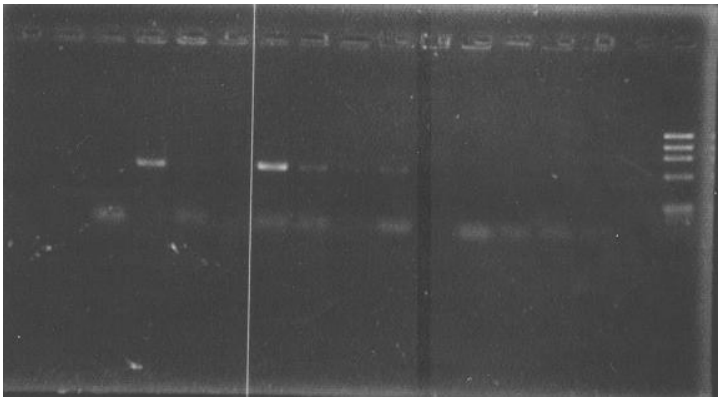


Figura 5.3: Check-gel da amplificação das amostras de DNAs degradados (*Genomi Phi TM DNA Amplification kit* ®)

5.2.3. Purificação dos amplicons

A purificação do produto de PCR separado por eletroforese foi realizada através de coluna de afinidade cromatográfica (*QI Aquick PCR Purification Kit*, *Qiagen*®), através de centrifugação, ou purificação por enzimas utilizando 1U da enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase; Amersham Biosciences*®*)* e 0,5U da enzima EXO (Exonuclease I; *USB*®) para cada 8µl de produto de PCR. Usando o termociclador com o seguinte programa, aproximadamente 40ng do produto da PCR foram purificados.

60’ - 37ºC
15’ - 80ºC
∞ - 10ºC

A quantificação do produto de PCR foi conduzida através da checagem em gel de agarose a 1,5%, usando marcador de peso molecular como referência para confirmação do tamanho dos amplicons (*Low DNA Mass Ladder*®*, Invitrogen*, *Carlsbad*, CA, USA).

5.2.4. Reação de sequenciamento

Para reação de sequenciamento foram utilizados os componentes descritos na Tabela 5.5. Esta reação segue o seguinte protocolo no termociclador:

$$\left.\begin{array}{c}\text{20'' - 95ºC}\\ \text{75' - 60ºC}\end{array}\right\}\ \text{35 X}$$

∞ - 10ºC

Tabela 5.5: Componentes da reação de sequenciamento

Componentes	Volume utilizado
Produto de PCR	μl (~40ng)
tampão MB (pré mix) (*Kit DYEnamic IT Dye Terminator*, Amersham Biosciences)	4 μl
Primer [2]*F/R(5μM)	0,6 μl
Água destilada	*.....μl
Volume final	10 μl

*o volume da água destilada varia, pois completa o volume final de 10 μl

5.2.5. Precipitação da reação de sequenciamento por *Sephadex*®

Para reações de 10uL: completa-se o volume com água bidestilada (Milliq®) caso o volume esteja muito menor que 10uL, adicionando, em seguida, 5uL de água bidestilada em cada amostra. O volume final teve um valor de aproximadamente 15uL.

1) Sobre uma folha de papel alumínio, coloca-se um pouco de *Sephadex G*-50 sobre um dos cantos do *Multiscreen column loader* (enchedor de colunas) e com o auxílio da espátula de acrílico que acompanha o enchedor, espalha-se o *Sephadex* em todas as cavidades do mesmo. Repete-se este processo até que todos os buracos fiquem cheios, sem transbordar e sem sobrar espaço.

2) Encaixa-se a placa *Multiscreen HV* sobre o enchedor de colunas de maneira que cada poço da placa corresponda a um poço do enchedor, transferindo, então, o *Sephadex* para a placa, virando o conjunto (placa + enchedor).

3) Adiciona-se 300µl de água bidestilada em cada poço da placa, embrulhando com filme plástico para evitar evaporação. Então, incubou-se por 3 horas (ou no máximo *overnight*) à temperatura ambiente. Se a placa não for usada no mesmo dia, esta deve ser armazenada a 4°C. Porém, antes de sua utilização, espera-se de 1 a 2 horas para o *Sephadex* chegar à temperatura ambiente.

4) Colocou-se uma placa de PCR de 96 orifícios embaixo da placa *Multiscreen*, fixando-a com fita adesiva. Centrifuga-se, então, a 650g (2100rpm na nossa centrífuga) durante 5 minutos. Descartou-se o volume que passou para a placa coletora e fixando novamente a placa *Multiscreen* à placa coletora com fita. As centrifugações foram feitas à temperatura ambiente.

5) Posteriormente, acrescentou-se 140µl de água bidestilada por poço. Centrifugou-se novamente a 650g (2100rpm na nossa centrífuga) durante 5 minutos. Descartou-se o volume que passou para a placa coletora e fixou-se, novamente, a placa *Multiscreen* à placa coletora com fita.

6) Sem adicionar mais água, um novo ciclo de centrifugamento foi realizado a 650g (2100rpm na nossa centrífuga) durante 2 minutos. Retirou-se a placa coletora e acoplou uma outra placa de PCR limpa na placa *Multiscreen*.

7) Adicionaram-se os 15µl do produto de sequenciamento ao centro de cada poço da placa. Centrifugou-se novamente a 650g (2100rpm na nossa centrífuga) por 5 minutos. Descartou-se, então, a placa *Multiscreen*.

---

[2]*Primers: F= *Forward* e R= *Reverse*

As amostras foram processadas em seqüenciador automático *MegaBACE*™ 1000 DNA *Analysis Systems (Amersham Biosciences*®).

5.2.6. Estatística e Análise dos Polimorfismos

A análise demográfica bem como da ocorrência de variações polimórficas dos genes estudados foi feita e apresentada através de estatística descritiva. Foram analisados os resultados desses sequenciamentos através dos programas (*softwares*) *Sequencher 4.5 Demo*® e *Bio Edit* ® e os SNPs (polimorfismo de um único nucleotídeo) pelo site da *National Center for Biotechnology Information-NCBI* (*www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP*).

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização da Amostra

Para o melhor entendimento da amostra estudada, inicialmente fez-se uma análise geral das características dos pacientes, conforme as Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3.

Ao caracterizar os pacientes por sexo e raça (Tabela 6.1), observa-se que a amostra estudada apresenta uma predominância do sexo masculino, totalizando 26 pacientes (57%). Pouco pôde ser observado quanto à raça do paciente uma vez que em 22% da amostra este dado não estava disponível. Porém, em termos de freqüência absoluta, os pacientes de cor clara predominaram. Ainda, não foi possível identificar o sexo e a raça do paciente em 2 fichas clínicas.

Tabela 6.1: Distribuição dos pacientes por sexo e raça.

Raça do Paciente	Sexo					Total	
	Feminino		Masculino		Não Ident.		
	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.		Abs.	Rel.
ME (mulato escuro)	2	11%	0	0%	0	**2**	**4%**
MM (mulato médio)	2	11%	8	31%	0	**10**	**22%**
MC (mulato claro)	3	17%	7	27%	0	**10**	**22%**
C (claro)	7	39%	6	23%	0	**13**	**28%**
Asiático	1	6%	0	0%	0	**1**	**2%**
Não identificado	3	17%	5	19%	2	**10**	**22%**
Total	**18**	**100%**	**26**	**100%**	**2**	**46**	**100%**

Quanto à região geográfica da qual os paciente são oriundos, Tabela 6.2, foi possível observar que a maioria deles era da região Nordeste do Brasil (52%), seguida pela região Sudeste (20%).

Tabela 6.2: Distribuição dos pacientes por região

	Freqüência

Região do Paciente	Absoluta	Relativa
Nordeste	24	52%
Sudeste	9	20%
Sul	1	2%
Nordeste x Sudeste	2	4%
Nordeste x Sul	1	2%
Outros	2	4%
Não identificado	7	15%
Total	**46**	**100%**

Esta predominância ocorre tanto entre o sexo feminino - 50% das pacientes mulheres são do Nordeste – como no sexo masculino – 58% dos pacientes homens são do Nordeste – conforme apresentado na Figura 6.1.

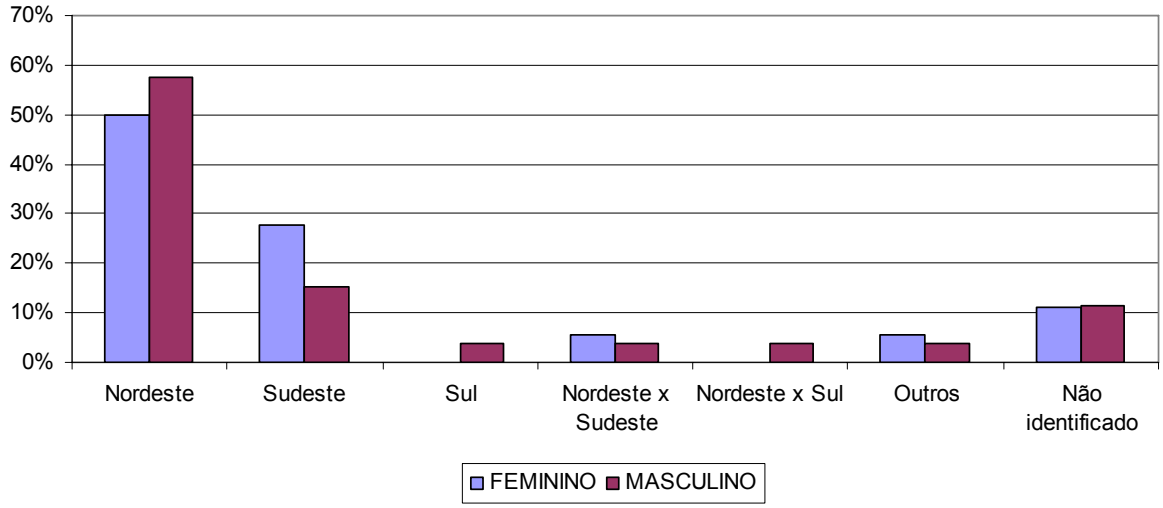


Figura 6.1: Distribuição dos pacientes por sexo e região de origem.

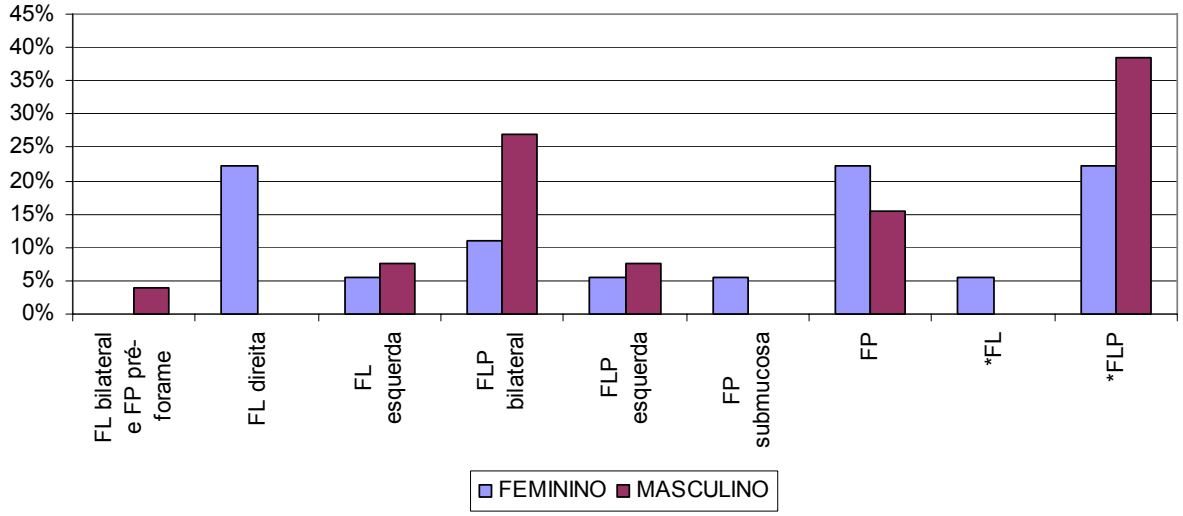
No que se refere ao tipo de fissura, observa-se uma predominância de FLP sem identificação do lado da fissura (30%). Nos casos em que o lado da fissura foi identificado, a FLP bilateral predominou entre os pacientes. A Tabela 6.3 apresenta a distribuição dos pacientes por tipo de fissura.

Tabela 6.3: Distribuição dos pacientes por tipo de fissura.

Tipo de Fissura	Freqüência Absoluta	Freqüência Relativa
FL bilateral e FP pré-forame	1	2%
FL direita	4	9%
FL esquerda	3	7%
FLP bilateral	9	20%
FLP esquerda	3	7%
FP submucosa	1	2%
FP	8	17%
*FL	1	2%
*FLP	14	30%
Não identificado	2	4%
Total	**46**	**100%**

*Lado da fissura não identificado

Ao avaliar os tipos de fissura com identificação do lado por sexo, Figura 6.2, observa-se que a FL direita e FP prevalecem entre as mulheres (22% das mulheres amostradas apresentaram FL direita e 22% FP). Já entre os homens não apareceu nenhum caso de FL, embora a FP também prevaleça, representando 27% dos pacientes do sexo masculino



*Lado da fissura não identificado

Figura 6.2: Distribuição dos pacientes por sexo e tipo de fissura.

É importante observar que em 38% das fichas clínicas dos pacientes do sexo masculino não constava o lado da fissura FLP, dificultando a análise do tipo de fissura para os pacientes do sexo masculino.

6.2. Análise do gene IRF6 em pacientes FLPNS

Obtivemos resultados de sequenciamento de 78 seqüências de pelo menos 37 diferentes pacientes, sendo 37 do exon 3, 19 do exon 4 e 22 do exon 7. A Tabela 6.4 apresenta a freqüência absoluta de pacientes para cada exon avaliado.

Tabela 6.4: Distribuição das avaliações por tipo de Exon

Sexo	Exon 3	Exon 4	Exon 7
Feminino	13	8	10
Masculino	22	9	10
Não identificado	2	2	2
TOTAL	**37**	**19**	**22**

No que se refere à presença de alteração das seqüências dos exons estudados, observou-se que esta foi negativa para os exons 3 e 4.

Na análise da seqüência do exon 7, observou-se duas formas de polimorfismo de base única (SNPs) em 3 (três) dos pacientes, 2 (dois) do sexo masculino (F1304-1; F1511-1) e 1(um) do sexo feminino (F1423-1) conforme detalhado abaixo.

F1304-1 (paciente do sexo masculino):

- ✓ SNPs

rs2235371= G por A, no exon 7, em heterozigose.

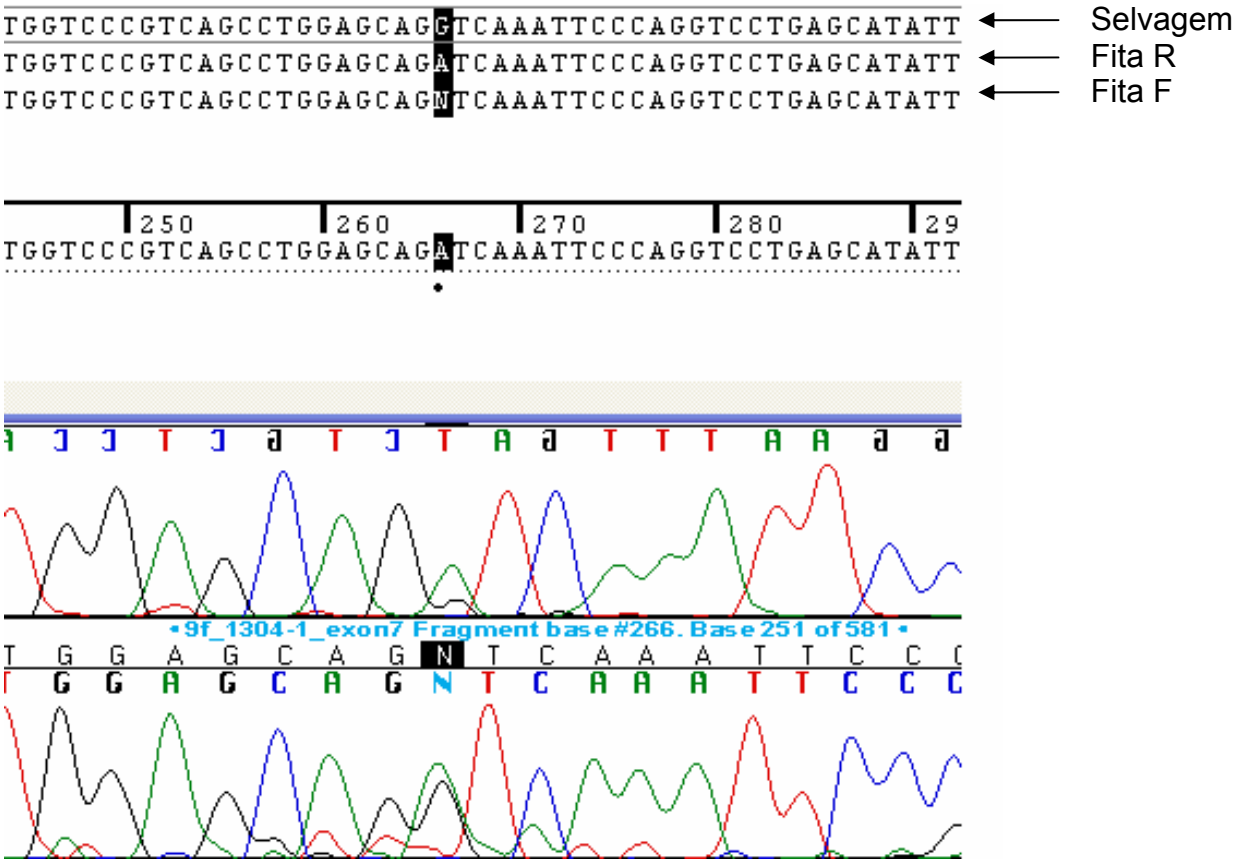


Figura 6.3: Imagem do SNP rs2235371, analisada através do *soft Sequencher Demo* 4.5®.

F1423-1 (paciente do sexo feminino)

✓ SNP:

rs2235373 = C por T, no intron 7 e em heterozigose.

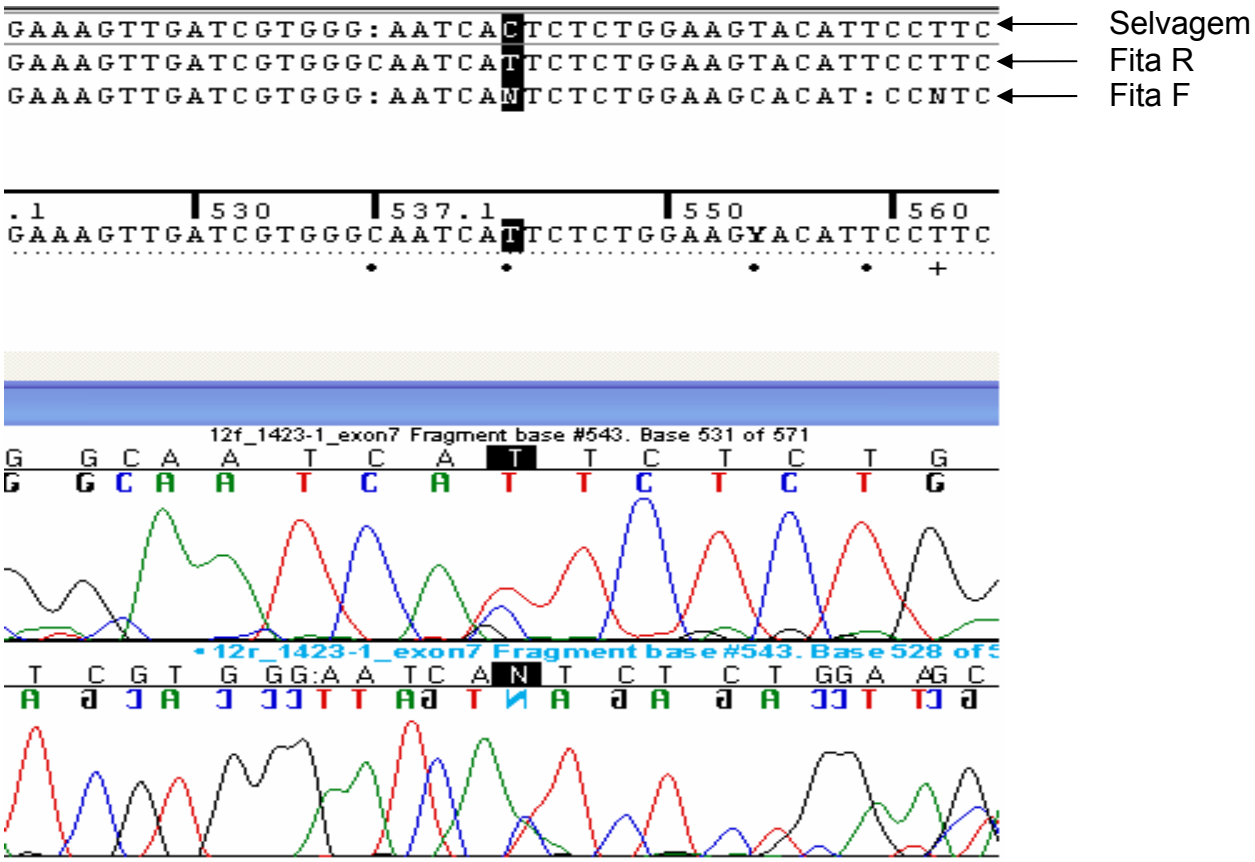


Figura 6.4: Imagem do SNP rs2235373, analisada através do *soft Sequencher Demo4.5*®.

F1511-1 (paciente do sexo masculino)

✓ SNP:

rs2235371= G por A, no exon 7, em homozigose.

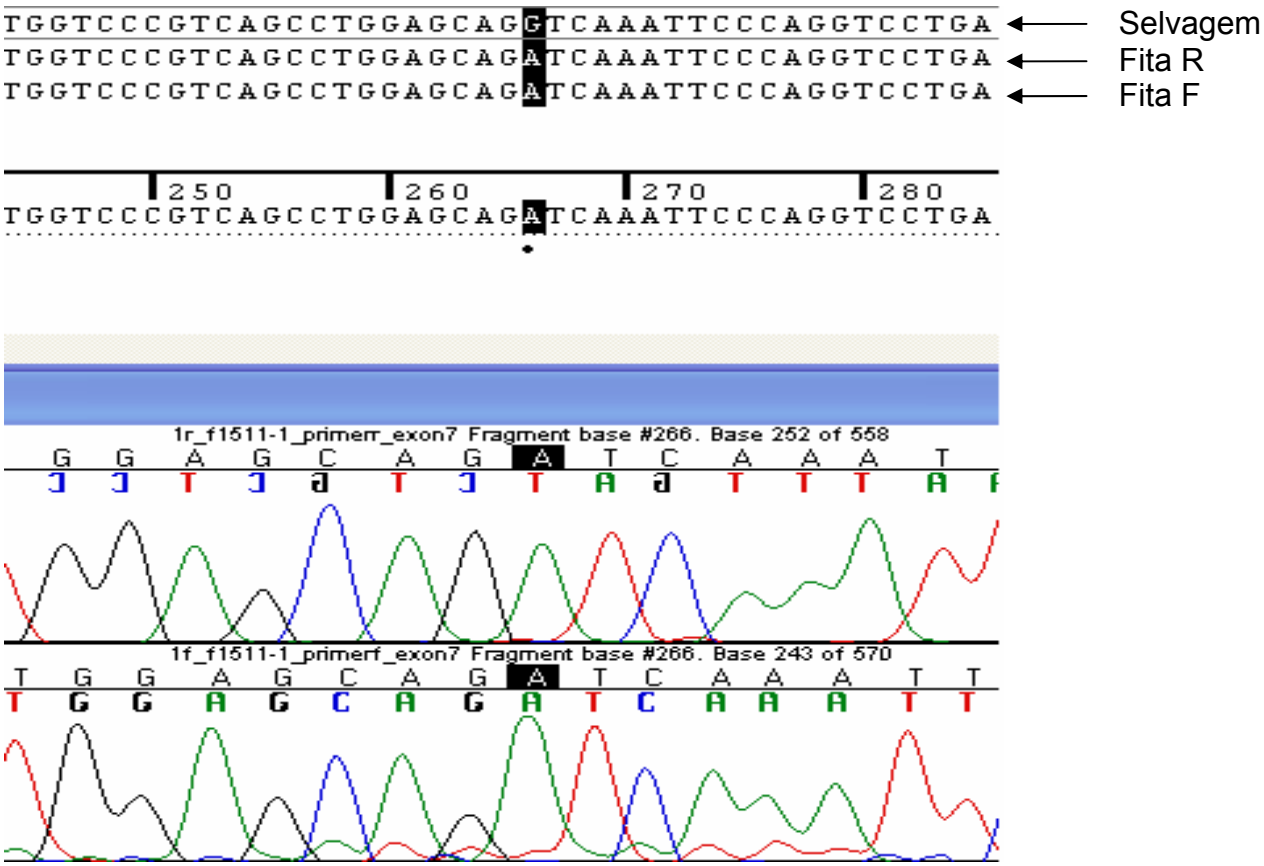


Figura 6.5: Imagem do SNP rs2235371, analisada através do soft Sequencher Demo 4.5®.

✓ SNP

rs2235373= C por T, no intro e em homozigose.

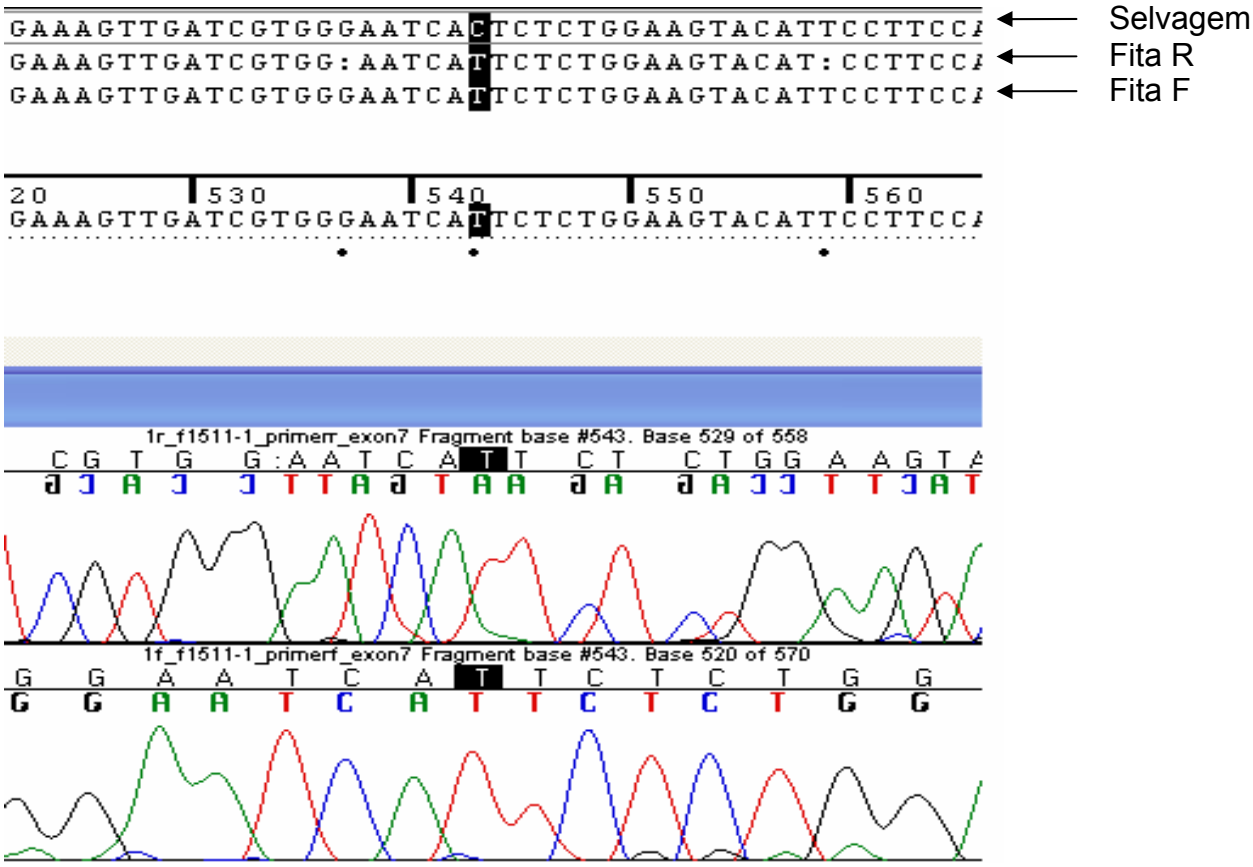


Figura 6.6: Imagem do SNP rs2235373, analisada através do *soft Sequencher Demo4.5*®.

Tabela 6.5: Polimorfismos já caracterizados identificados no exon e intron 7

Gene	Posição	Localização	SNP	[3]Número no SNPbank NCBI	Número de pacientes da nossa amostra
IRF6	Fragmento 552	Intron 7	C/T	rs225373	2
IRF6	Fragmento 275	Exon 7	A/G	rs2235371	2

Os SNPs rs225371 e rs2235373 apresentaram, em nossa pesquisa, a freqüência rs225371 de 2.2% (1 alelo/ 44 cromossomos) e rs2235373 de 6.8% (3 alelos/44). Um dos pacientes o apresentou esses dois tipos de SNP em homozigose, enquanto os outros dois pacientes apresentaram um dos SNPs mencionados ambos em heterozigose. Visto que pesquisas internacionais anteriores já descreveram este fenômeno, não se fez necessária a realização de caso controle dos polimorfismos na amostra deste estudo (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=225371).

Estes resultados, portanto, sugerem que as alterações encontradas no gene IRF6, na amostra analisada, não estão associadas ao quadro clínico de FLPNS. Nesse contexto é importante ressaltar que não foi identificada na amostra estudada qualquer mutação do gene IRF6 que pudesse explicar o fenótipo.

[3]Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=225373;http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=2235371.

7. DISCUSSÃO

A relativa freqüência dos defeitos da face em diferentes populações tem feito deste um tópico de suma importância na pesquisa genética de anomalias do desenvolvimento crânio-facial. O diagnóstico preciso se faz imperativo e nesse contexto o exame clínico de um portador de fissura lábio-palatina tem papel preponderante. Este deve ser realizado com especial atenção na detecção de anomalias associadas, independente de sua extensão (Charrow,1990). Essa observação, na presença de anomalias adicionais, pode se apresentar como sinal da presença de uma síndrome da qual a fissura é apenas uma das manifestações clínicas. Mais recentemente, graças a vários avanços da medicina e biologia molecular que culminaram na implementação do projeto genoma, uma série de testes moleculares anteriormente restritos à comunidade científica se tornou também aplicável ao diagnóstico genético. O sequenciamento genômico automático tem aumentado sua participação na rotina médica e constitui uma ferramenta de complementação clínica imprescindível atualmente.

Têm-se postulado um modelo de herança multifatorial para as FL/P e FP não-sindrômicas. Nestes casos, o risco de repetição de um segundo caso na genealogia é baixo, estimado em 4% (Gorlin *et al*., 2001). Já as fissuras sindrômicas podem ser causadas por aberrações cromossômicas, mutações gênicas ou tem origem teratogênica (Gorlin *et al*., 2001). Dentre as formas sindrômicas destaca-se a síndrome de Van der Woude (SVW), que é uma condição mendeliana de herança autossômica dominante (Muenke, 2002). Mutações no gene *IRF6* são responsáveis pela maioria dos casos desta síndrome, que se caracteriza pela presença de comissuras ("*pits*") no lábio inferior, fissura labial e palatina. O espectro de

variabilidade clínica é muito amplo e não é possível distinguir clinicamente os pacientes com a SVW que não apresentam "*pits*" daqueles portadores das formas de FL/P ou FP não-sindrômica. A distinção entre estas duas formas é extremamente importante, pois o risco de recorrência difere significativamente entre os casos de fissura não sindrômica (4%) e SVW (50%) (Gorlin *et al*., 2001). Isso posto, torna-se necessário o correto diagnóstico para fins de acompanhamento e aconselhamento genético das famílias envolvidas. Borges-Osório e Robinson (2001) relatam que o aconselhamento genético deve ser transmitido através de sólidas fundamentações diagnósticas sobre a doença ou anomalia, que constituirá risco para a família do portador de tal doença genética. Consequentemente, diagnósticos imprecisos podem levar a aconselhamentos imprecisos. A análise do gene IRF6 tem sido empregada como um meio de se distinguir os casos de SVW sem "*pits*" daqueles com fissuras não sindrômicas. Estima-se que 2% dos casos de fissurados não-sindrômicos representem casos de SVW (Kondo, et al., 2002; Ghassibé, 2004). Com a identificação do gene IRF6 como o responsável pela SVW, é possível atualmente testar-se esta hipótese.

Visando avaliar a existência de pacientes portadores da síndrome de Van der Woude (SVW) inicialmente diagnosticados com fissura lábio-palatino não-sindrômica (FLPNS), decidiu-se realizar um estudo de caso com pacientes com este diagnóstico a partir de um banco de DNA de paciente com fenda representativo da população brasileira. Buscou-se ainda traçar o perfil da amostra, cruzando os dados das seqüências do gene IRF6 e com as características dos pacientes amostrados. Devido a limitações logísticas optou-se por utilizar uma técnica de amostragem não-probabilística por conveniência, de acordo com a disponibilidade para análise de amostras de DNA. Embora esta técnica não seja ideal para inferir conclusões

generalizadas sobre a população alvo como um todo, pois resulta em uma amostra eventualmente não representativa, ela pode ser bastante útil na obtenção de informações sobre o grupo avaliado. É importante ressaltar que a técnica de amostragem escolhida é a mais indicada para o referido estudo de caso, uma vez que a escolha por uma técnica de amostragem probabilística seria impraticável em nosso caso: a coleta de DNA exigiria a utilização de recursos não disponíveis durante o período da pesquisa.

A FLP é um distúrbio multifatorial causado por uma combinação de fatores genéticos e interações ambientais. Cada fator pode contribuir diferentemente nesse tipo de defeito em populações diferentes (Srichomthong, Siriwan e Shotelersuk, 2005). O objetivo do presente trabalho foi investigar um possível diagnóstico sub-clínico da Síndrome de Van der Woude (SVW), ou diagnóstico genético. Contudo, não foi encontrada nenhuma nova ou previamente reportada mutação no gene IRF6 que poderia enquadrar os pacientes estudados, classificados clinicamente como não-sindrômicos, como na realidade portadores da SVW. Outros estudos mostram que a SVW pode se apresentar através dos sinais clínicos como não-sindrômica em 2% desses casos (Gorlin et al 2001; Ghassibé 2004; Zucchero, et al, 2004). Tal prevalência é relativamente baixa, mas difere de nossos resultados onde nenhum caso de SVW foi encontrado relacionado à análise do *IRF6*. Isso se deve, provavelmente, a diferenças na população analisada e/ou ao número restrito de indivíduos incluídos no presente trabalho. Essas diferenças suscitam investigações adicionais envolvendo um número significativamente maior de indivíduos.

Além disso, é importante mencionar que existem precedentes de casos de SVW não relacionados ao gene IRF6 (Kondo et al., 2002), achados esses que reforçam a existência de heterogeneidade não alélica na SVW ou, alternativamente,

a presença de mutações que não são detectadas pelas técnicas convencionais de análise de sequenciamento de exons e de introns flanqueadores. Tais mutações poderiam ser mudanças de nucleotídeos em regiões promotoras ou intrônicas, deleção, duplicação, rearranjos, deleção no cromossomo 1q32-q41 e eventualmente microdeleção cromossômica (Kayano, 2003). Considerando o foco do presente estudo, não se pode descartar a possibilidade de um ou mais pacientes serem portadores de alterações distintas daquelas inflingidas por mutações do gene IRF6. Futuras análises deverão rastrear outras possíveis causas de SVW nessa mesma população.

Por outro lado, nas amostras utilizadas neste trabalho foram identificados 2 SNPs (rs2235371 e rs3335371), presentes em 2.2% e 6.8% dos pacientes, respectivamente. Estudos anteriores já haviam detectado esses polimorfismos e não encontraram nenhuma evidência que sugerisse que estes SNPs estivessem associados à alguma alteração relacionada ao fenótipo do paciente (UCSC *Genome Bioinformatics*, 2006; NCBI, 2006). Outros polimorfismos já foram descritos no gene *IRF6*, porém não foram encontrados na amostra coletada. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=225371.

Em relação aos dados clínicos da amostra, conforme já conhecido na literatura, a maior parte dos afetados era do sexo masculino, estando esse achado de acordo com outros relatos (Marazita et al., 2002 e Jugessur et al., 2003). Em pacientes não-sindrômicos, há maior prevalência de fissuras labiais com ou sem envolvimento palatino (FL/P) do que fissuras palatinas isoladas (FP) (Vieira e Orioli, 2001). De acordo com os dados coletados neste trabalho, sobre o tipo de fissura, a que mais predominou foi a FLP sem o lado relatado, demonstrando-se assim inconclusiva a análise. Contudo, a classificação que omite o lado acometido é semelhante aos

dados descritos dos autores Cohen, et al (1998); Schutte e Murray (1999) e Vieira e Orioli (2001), que verificam também uma maior incidência desse tipo de fissura sem descreverem o lado acometido.

Segundo Gorlin et al. (2001), Cohen et al. (1998) e Vieira e Orioli (2001), a fissura palatina isolada (FP) é mais freqüente no sexo feminino. Este achado também foi observado nessa pesquisa visto que, a maioria das incidências de FP observadas também foi do sexo feminino, com 22%, enquanto que no sexo masculino tal percentual foi de 15% em relação à amostra total. A despeito da similaridade de resultados nesse quesito, uma explicação plausível substanciada por bases biológicas para essa prevalência de alterações no sexo feminino não foi encontrada.

O presente trabalho constitui o primeiro esforço concentrado em validar achados que estabelecem mutações no gene IRF6 como sendo diretamente relacionadas à manifestação da síndrome de Van der Woude em uma população brasileira. Os resultados aqui apresentados divergiram de relatos prévios, pois na amostra analisada não foram encontradas mutações patológicas do gene IRF6. Estudos adicionais avaliando esses mesmos polimorfismos em um número maior de indivíduos e em populações de outras regiões poderão fornecer importantes informações demográficas sobre a ocorrência e distribuição da SVW no Brasil.

8. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o diagnóstico clínico proferido na população estudada foi propriamente conduzido, compatível com a condição apresentada por esses pacientes. Assim, esse grupo poderá obter um aconselhamento e planejamento genético com melhores informações diagnósticas sobre seu perfil genético. Será fundamental acompanhar essas famílias e verificar em progenias futuras a ocorrência de FL/P

A necessidade de amostras maiores pode ser considerada para identificar mutações no gene *IRF6*, sendo necessária à realização de estudos adicionais, onde, além de procurar ampliar a amostra, deve discriminar melhor as populações analisadas com base em suas características demográficas e raciais. Além disso, a análise de um número maior de polimorfismos e a identificação de novas alterações na seqüência do *IRF6,* que possam ser correlacionadas a deformidades faciais sindrômicas ou não, constituem uma importante etapa no correto diagnóstico e aconselhamento genético de pacientes de risco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AU, W.C.; et al. Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. **Proc.Natl.Acad.Sci**. USA, v.92, p.11657-11661, dec, 1995.

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

BURDICK, A. B. Genetic epidemiology and control of genetic expression in Van der Woude syndrome. **Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology** (Supplement). v. 2, p. 99-105, 1986.

CHARROW, J. Genetics of cleft lip and palate. In: KERNAHAN, D. A.; ROSENSTEIN, S.W. **Cleft Lip and Palate: a system of management**. Baltimore: Willians e Wilkins, 330 p, cap 3, p.20-27, 1990.

COLLARES, M. V. M., et al. Fissuras labiopalatinas: incidência e prevalência da patologia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Um estudo de 10 anos. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, v.39, n.3, p.183-188, Jul-Set, 1995.

COX, T.C. Taking it to the max: the genetic and developmental mechanisms coordinating midfacial morphogenesis and dysmorphology. **Clinical Genetics,** v. 65, p. 163-176, 2004.

COHEN, L.A.; SHAW, G.M.; WASSERMAN, C.R.; TOLOROVA, M.M. Raciall and ethnic variation in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. **Am J Med Genet**, v. 79, p. 42-47, 1998.

FICK, L.H.; MARCHIORO, E.M. Incidência, Classificação, Etiologia e Embriologia das Fissuras Bucais. (tradução) THORNTON, J. B.;NIMER, S.; HOWARD, P. S. The incidence, classification, etiology, and embryology of oral clefts. In: Seminars in Orthodontics. Philadelphia: W. B. Saunders, September, 1996. v.2, n.3, p.162-168). **Revista Odonto Ciência**, n. 25, p. 227-239, 1998.

FOGH-ANDERSEN, P. Genetic and non-genetic factors in the etiology of facial cleft. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 1, p. 22-29, 1967.

FRASER, F.C. The genetics of cleft lip and cleft palate. **American Journal of Human Genetics**, v. 22, p. 336–352, 1970

FURLANETO, E.C.; PRETTO, S.M. Estudo epidemiológico dos pacientes atendidos no Serviço de Defeitos da Face da PUCRS. **Revista Odonto Ciência**, n.29, p. 39-56, 2000.

FURLANETO, E.C.; ROBINSON, W.M.; BORGES-OSÓRIO, M.R. Anomalias associadas às fissuras labiopalatais em uma amostra de pacientes em tratamento no Serviço de Defeitos da Face da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. **Revista Odonto Ciência**, v. 18, n.39, p. 39-50, 2003.

GASPAR, D.A ; et al. Evidence that BCL3 plays a role in the etiology of nonsyndromic oral clefts in Brazilian families. **Genet Epidemiol**, v.23, n.4, p. 364-74, nov., 2002.

GASPAR, D.A; et al. Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. **European Journal of Human Genetics,** v. 12, p. 521-526, 2004.

GHASSIBÉ, M. Six families with Van der Woude and/or popliteal pterygium syndrome: all with a mutation in the *IRF6* gene. **J Med Genet**; 41:e15, 2004.

GORLIN, R.J.; COHEN, M.M. JR.; LEVIN, L.S. Syndromes of the Head and Neck. 4d ed. Oxford University Press, New York, 2001.

GORLIN, R.J.; COHEN, M.M. JR.; LEVIN, L.S. Syndromes of the Head and Neck. 3d ed. Oxford University Press, New York, 1990.

HATADA, S.; et al. An interferon regulatory factor-related gene (xIRF-6) is expressed in the posterior mesoderm during the early development of Xenopus laevis. **Gene**, v. 203, p.183–188, 1997.

HOUDAYER, C.;et al. Linkage analysis of 5 novel van der Woude syndrome kindreds to 1q32-q41 markers further supports locus homogeneity of the disease trait. **Annales de Génétique**, v.42, p. 69-74, 1999.

JANKU, P.; et al. The van der Woude syndrome in a large kindred: variability, penetrance, genetic risks. **American Journal of Medical Genetics**, v. 5, p. 117-123, 1980.

NEHYBA,J.; et. al . A Novel Interferon Regulatory Factor (IRF), IRF-10, has a unique role in immune defense and is induced by the v-rel oncoprotein. **Molecular and Cellular Biology**; p. 3942-3957, Vol. 22, June, 2002.

JOHNSEN, D.C. Princípios de Formação da Fissura de Lábio e de Palato.In:_BISHARA, S.E. **Ortodontia**. Ed. Santos: São Paulo, p.25-30; 39-42, 2004.

KAYANO, S. Novel *IRF6* mutations in Japanese patients with Van der Woude Syndrome: two missense mutations (R45Q and P396S) and a 17-kb deletion. **J Hum Genet**, v.48, p.622–628, 2003.

KATCHBURIAN, E. ; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan/Panamericana, 1999.

KONDO et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and Popliteal Pterygium Syndromes. **Nat Genet**.; v.32; n.2; p. 285-9, out, 2002.

LI, W.; et al. Interferon Regulatory Transcription Factors Are Constitutively Expressed and Spatially Regulated in the Mouse Lens. **Developmental Biology.** v.10, p. 44–55, 1999.

LIDRAL, A. C.; et al . Studies of the candidate genes *TGFB2, MSX1, TGFA*, and *TGFB3* in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. **Cleft Palate Craniofac J** ; v.34; n.1; p.1-6, jan, 1997.

LIDRAL, A.C.; MURRAY, J. C. Genetic approaches to identify disease genes for birth defects with cleft lip/palate as a model. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**; v. 12, p. 893-901, 2004.

LIDRAL, A. C.; REISING, B. C. The role of *MSX1* in Human Tooth Agenesis. **J Dent Res**, v. 81, n. 4, p. 274-278, 2002.

LOFFREDO, L.C. M.; FREITAS, J.A.S.; GRIGOLLI, A.A.G. Prevalência de fissuras orais de 1975 a 1994. **Rev Saúde Pública**, v. 35, n. 6, p. 571-5, 2001.

LYNCH, H.T.; KIMBERLING, W.J. Genetic counseling in cleft lip and cleft palate. **Plast Reconstr Surg**; v.68, n.5, p.800-15, nov, 1981.

MAMANE, Y.; et al. Interferon regulatory factors: the next generation. **Gene**. 3; v.237, n.1, p.1-14, sep, 1999.

MARTINS, D. Estudo de associação em família com fissura labial e/ou palatina não-sindrômica. **Tese**, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo-USP-SP; 2002.

MATSUZAWA, N.; et al . Two missense mutations in the IRF6 gene in two Japanese families with Van der Woude syndrome. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**; v.98,p.414-7, 2004.

MITCHELL, E.L.; et al. Evolution of two putative susceptibility loci for oral clefts in the Danish Population. **American Journal of Epidemiology**; v. 153, n. 19, p.1007-1015, 2001.

MOORE, K. ; PERSAUD, T. **Embriologia Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.448, 1994.

MUENKE, M . The pit, the cleft and the web. **Nature Genetics**, v. 32, out, 2002.

MURRAY, J.C. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. **Clin Genet**.; v.61, p. 248-256, 2002.

NGUYEN, H.; HISCOTT, J. ; PITHA, M.P. The growing family of interferon regulatory factors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**; vol.8, n.4, p.293-312, 1997.

OLIVEIRA, N.A.J. Estudo molecular das craniossinostoses sindromicas: Crouzon, Pfeiffer e Saethre-Chotzen. **Dissertação**, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo-USP-SP; 2006.

POERNER, F. Estudos genéticos em pares de irmãos portadores de fissura lábio-palatina. **Tese**, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo-USP-SP; 2005.

RINTALA, A.E.; RANTA, R. B. Lower lip sinuses: I. Epidemiology, microforms and transverse sulci. **J Plast Surg**; v.34,n.1,p.26-30, jan, 1981.

SCHUTTE, B.C.; MURRAY, J.C. The many faces and factors of orofacial clefts. **Human Molecular Genetics**, v. 8, n.10, p.1853-1859, 1999.

SERTIE, A.L., SOUSA, A.V., STEMAN, S., PAVANELLO, R.C., PASSOS-BUENO MR. Linkage analysis in a large Brazilian family with van der Woude syndrome suggests the existence of a susceptibility locus for cleft palate at 17p11.2-11.1. **Am J Hum Genet**; v.65, n.2, p.433-40, ago, 1999.

SHOTELERSUK, V.; et al .A novel mutation, 1234del(C), of the IRF6 in a Thai family with Van der Woude syndrome. **International Journal of Molecular Medicine**; v.11, p. 505-507, 2003.

SLAVKIN, H.C. Incidence of cleft lips, palates rising. **Am Dent Assoc**.; v.123, n.11. p. 61-5, nov, 1992.

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**; 42(7):e46, jul, 2005.

SULIK, K. K.; et al. **Embryo Images: Normal and Abnormal Mammalian Development.** Disponível em <http://www.med.unc.edu/embryo_images/>. Acesso em: 10 abr. 2006.

TANIGUCHI, T.; et al. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. **Annu Rev Immunol**; v.19, p.623-55, 2001.

TOLAROVA, M.M.; CERVENKA, J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. **Am J Med Genet**. V.13, n.75, f.2, p.126-37, jan, 1998.

TOLAROVA, 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**.; v.21, n.1, p.19-25, 1987.

UCSC Genome Bioinformatics. Disponível em <http://genome.ucsc.edu/>. Acesso em: 10 abr. 2006

VANDERAS, A.P. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. **Cleft Palate J**.; v.24, p. 216-225, 1987.

VAUGHAN, C. Anesthetic management of children with craniofacial anomalies. **CRNA**; v.8, n.4, p.123-34, nov, 1997.

VIEIRA, A.R.; ORIOLI, I.M. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, v. 68, n. 4, p. 272-9, jul-aug 2001.

WONG, F.K.; HAGG, U. An update on the aetiology of orofacial clefts. **Hong Kong Med J**.; v.10, n.5, p.331-336, out, 2004.

YE, X.Q.; et al .Identification of novel mutations of IRF6 gene in Chinese families with Van der Woude syndrome. **Int J Mol Med**.; v.16, n.5, p.851-6, nov, 2005.

ZHOU, Q. J.; et al. Survey of the patients with cleft lip and palate in China who were funded for surgery by the Smile Train Program from 2000 to 2002. ,Chinese Medical Journal, v.119, n. 20, p.1695-1700, 2006.

ZUCCHERO, T.M.; et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. **N Engl J Med**.; v. 19, n. 351, f. 8, p. 769-80, ago, 2004.

ANEXO A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(maiores de18 anos)

ESTUDO: Triagem de mutações no gene IRF6 em casos de fissura lábio-palatina não sindrômica

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Eu,..... , portador da Cédula de identidade, RG ..... , e inscrito no CPF/MF..... nascido(a) em _____ / _____ /_____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo de Triagem de mutações no gene IRF6 em casos de fissura lábio-palatina não sindrômica, e esclareço que obtive todas as informações.

Estou ciente que:

I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada ***fissura lábio-palatina***;

II) Será feita uma coleta de 10 ml. de sangue;

III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o meu tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue);

IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

VII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(maiores de18 anos)

ESTUDO: Triagem de mutações no gene IRF6 em casos de fissura lábio-palatina não sindrômica

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Eu,..... , portador da Cédula de identidade, RG ..... , e inscrito no CPF/MF..... nascido(a) em _____ / _____ /_____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo de Triagem de mutações no gene IRF6 em casos de fissura lábio-palatina não sindrômica, e esclareço que obtive todas as informações.

Estou ciente que:

I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada ***fissura lábio-palatina***;

II) Será feita uma coleta de 10 ml. de sangue;

III) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o meu tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue);

IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

VII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa:

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VIII) Caso tenham sido tiradas fotografias,

( ) concordo que sejam incluidas em publicações cientificas, se necessário

( ) concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde

( ) não concordo que sejam incluidas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

IX) O material colhido será armazenado por um tempo considerado necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação e/ou mecanismo genético responsável pela doença observada na sua família.

São Paulo, de de 200_

Pesquisador responsável (orientador)- Prof. Dr. Eraldo Batista Júnior, telefone para contato : (51)84162112

Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS, telefone(51)33203000-ramal:3345

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(menores de 18 anos)

ESTUDO: Triagem de mutações no gene IRF6 em casos de fissura lábio-palatina não sindrômica

Seu (Sua) filho(a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Eu ....., RG ....., abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho(a) ..... nascido(a) em _____ / _____ /_____ , participe do estudo de Triagem de mutações no gene IRF6 em casos de fissura lábio-palatina não sindrômica, e esclareço que obtive todas informações necessárias.

Estou ciente que:

I) O estudo se faz necessário para que possam descobrir as possíveis causas da doença denominada ***fissura lábio-palatina;***

II) Será feita uma coleta de 10ml. de sangue do(a) meu(minha) filho(a);

III) Essas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciará no tratamento de meu (minha) filho(a); não vai curá-lo (a); não causará nenhum problema, exceto a dor da picada da agulha no local da coleta;

IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e sem que venha interferir no atendimento ou tratamento médico;

VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu filho sejam mencionados;

VII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa:

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VIII) Caso tenham sido tiradas fotografias,

( ) concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário

( ) concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde

( ) não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

IX) O material colhido será armazenado pelo tempo considerado necessário para a identificação e caracterização do gene e de sua mutação e/ou mecanismo genético responsável pela doença observada na sua família.

São Paulo, de de 200_.

Pesquisador responsável (orientador)- Prof. Dr. Eraldo Batista Júnior, telefone para contato : (51)84162112

Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS, telefone(51)33203000-ramal:3345

ANEXO B: Carta do CEP

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 0178/07-CEP

Porto Alegre, 26 de janeiro de 2007.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 06/03475, intitulado: **"Estudo do gene IRF6 em uma amostra de pacientes portadores de fissuras labiopalatinas não-sindrômicas através da triagem de mutação por seqüenciamento automático".**

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser entregues a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Prof Dr Eraldo Luis Batista Junior
N/Universidade

PUCRS
Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3ºandar – CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep