

FABIO KARDAUKE

**ESTUDO MOLECULAR DO GENE *IRF6* EM PACIENTES COM FISSURAS
LABIOPALATAIS NÃO SINDRÔMICAS DO ESTADO DO PARANÁ.**

**MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
PUCPR**

**CURITIBA
2018**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Giovanna Carolina Massaneiro dos Santos – CRB 9/1911

K18e
2018 Kardauke, Fabio
 Estudo molecular do gene IRF6 em pacientes com fissuras labiopalatais não
 sindrômicas do estado do Paraná / Fabio Kardauke ; orientador: Salmo Raskin.
 – 2018.
 57 f. : il. ; 30 cm

 Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
 Curitiba, 2018
 Bibliografia: f. 30-34

 1. Ciências da saúde. 2. Palato - Anomalias. 3. Variação genética.
 4. Seleção genética .5. Genes. I. Raskin, Salmo. II. Pontifícia Universidade
 Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
 III. Título.

CDD 20 ed. – 610



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL
DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos dois dias do mês de maio de 2018 às 13hs e 30min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação **"ESTUDO MOLECULAR DO GENE IRF6 EM PACIENTES COM FISSURAS LABIOPALATAIS NÃO SINDRÔMICAS DO ESTADO DO PARANÁ"** apresentado por **Fábio Kardaue** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Salmo Raskin- Presidente (PUCPR)	<i>Approved Salmo Raskin</i>
Prof. Dr. Cleber Machado de Sousa - (PUCPR)	<i>Approved Cleber</i>
Profa. Dra. Liya Regina Mikami (FEPAR)	<i>Approved Liya</i>

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Salmo Raskin	Conceito: <u>Approved</u>
Prof. Dr. Cleber Machado de Sousa	Conceito: <u>Approved</u>
Profa. Dra. Liya Regina Mikami	Conceito: <u>Approved</u>

Parecer Final: Approved

Observações da Banca Examinadora:

Salmo Raskin
Prof. Dr. Salmo Raskin
Presidente da Banca Examinadora

Graciela Baena
Prof. Dra. Graciela Baena
Coordenadora do PROCS-PUCPR

RESUMO

Introdução: As fissuras labiopalatais não sindrômicas (FLP/NS) são malformações congênitas de lábio e/ou cavidade oral. A expressão clínica das FLP/NS é muito variável podendo levar a diversos níveis de deformidade facial e disfunção oromotora. Uma região cromossômica associada à FLP/NS e foco de estudos mais recentes é a 1q32.2, onde está localizado o gene *IRF6*. Alguns estudos sobre o gene *IRF6* mostraram altos níveis de RNAm ao longo da borda medial da fusão do palato, germes dentários, folículos pilosos, genitália e pele. Outros estudos demonstraram que haploinsuficiência de *IRF6* interrompe o desenvolvimento orofacial e são consistentes com as mutações dominantes que modificam o desenvolvimento da pele e órgãos genitais. Apesar da associação bem reconhecida de variantes neste gene com formas sindrômicas de FLP, ainda há muito a ser estabelecido em relação as formas não sindrômicas. **Objetivos:** Este estudo foi realizado a fim de investigar a existência de possíveis variantes genéticas no gene *IRF6* e o fenótipo de fissura labiopalatal não sindrômica (FLP/NS) em pacientes residentes no estado do Paraná. **Métodos:** Foram selecionados 33 pacientes com FLP/NS que pertenciam a famílias multiplex com ao menos um outro indivíduo afetado por FLP/NS em três gerações. O DNA extraído das amostras de sangue periférico foi submetido ao processo de amplificação completo do gene *IRF6* por meio da técnica de PCR. Após a confirmação do sucesso da amplificação da PCR em gel de agarose a 1%, os produtos de PCR (amplicons) relativos a cada segmento para cada paciente foram misturados em um único tubo (realização de um *pool*). Cada *pool* contendo amostras de pacientes diferentes foi preparado para o sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando o kit Nextera DNA Library Prep Kit (Illumina). As sequências produzidas foram convertidas em arquivos no formato *FastQ*, *bam/bai* e *vcf*. Estes dados foram utilizados em estudo comparativo entre os pacientes e os bancos de dados populacionais 1000 Genomes Project (1000G), gnomAD e AbraOM, em busca de variações genéticas. **Resultados:** Dentre as variantes no gene *IRF6* já bem estabelecidas na literatura, obteve-se resultados de frequências alélicas similares com: rs861019, rs2235375, rs2013162, rs2235371 e rs2235373. Além da presença das variantes supracitadas, também foi encontrado duas variantes classificadas como inéditas. A variante g.17743T>C foi

observada em um paciente ($p < 0,0001$) e g.4646_4647insCCTAA também em somente um paciente ($p < 0,0001$). Ambas as variantes foram previstas como possivelmente patogênicas por testes *in silico* pois tem como consequência o ganho de um códon que normalmente tem função de região doadora de *splice*. **Conclusão:** O presente estudo reforçou a importância da presença de variantes no gene *IRF6* e identificou variantes ainda não descritas no banco de dados genéticos brasileiro AbraOM. Além disto, relatamos a presença de duas variantes inéditas com potencial patogênico ainda não descritas na literatura atual em pacientes oriundos de famílias multiplex com Fissura Labiopalatal não Síndrômica do estado do Paraná, ajudando a consolidar e ampliar os dados genéticos e populacionais relacionados a este fenótipo.

Palavras-chave: Gene *IRF6*; Fissura Labiopalatal Não Síndrômica; NGS.

ABSTRACT

Introduction: Non-syndromic cleft lip and palate (NS/CLP) are congenital malformations of the lip and / or oral cavity. The clinical expression of NS/CLP is variable and may lead to different levels of facial deformity and oromotor dysfunction. Some studies on the *IRF6* gene showed high levels of mRNA along the medial border of the fusion of the palate, dental germs, hair follicles, genitalia and skin. Other studies have demonstrated that haploinsufficiency of *IRF6* disrupts orofacial development and is consistent with dominant mutations that modify the development of the skin and genitals. Despite the well-known association of variants in this gene with syndromic cleft lip, there is still much to be established regarding non-syndromic syndromic forms. **Objectives:** This study was carried to investigate the existence of possible genetic variants in the *IRF6* gene and the phenotype of non-syndromic cleft lip and palate NS/CLP in patients living in the state of Paraná. **Methods:** We selected 33 patients with NS/CLP who belonged to multiplex families with at least one other individual affected by this phenotype in three generations. The DNA was extracted from peripheral blood samples and submitted to the complete amplification process of the *IRF6* gene by PCR technique. After confirming the success of PCR amplification, the products (amplicons) relative to each segment for each patient were mixed in a single tube (pooling). Each pool containing samples from different patients was prepared for the next generation sequencing (NGS) using the Nextera DNA Library Prep Kit (Illumina). The sequences produced were converted to FastQ, bam / bai and vcf files. These data were used in a comparative study between the patients and the population databases 1000 Genomes Project (1000G), gnomAD and AbraOM, in search of genetic variations. **Results:** Among the variants in the *IRF6* gene already well established in the literature, we obtained results of similar allelic frequencies with: rs861019, rs2235375, rs2013162, rs2235371 and rs2235373. In addition to the presence of these variants, we also found two new variants unpublished. The g.17743T> C variant was observed in one patient ($p < 0.0001$) and g.4646_4647insCCTAA also in only one patient ($p < 0.0001$). Both variants were predicted to be pathogenic by in silico tests because it results in the gain of a codon that normally has a splice donor region function. **Conclusion:** The present study reinforced the importance of the presence of variants in

the *IRF6* gene and identified variants not yet described in the Brazilian genetic database AbraOM. In addition, we reported the presence of two unpublished variants with pathogenic potential not yet described in current literature in patients from multiplex families with non-syndromic cleft lip in the state of Paraná, helping to consolidate and amplify the genetic and population data related to this phenotype.

Keywords: *IRF6* gene; Non-Syndromic Cleft Lip; NGS.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
A fissura labiopalatal	1
Estudos do componente genético e etiológico das fissuras labiopalatais não sindrômicas	2
Famílias multiplex	3
O gene <i>IRF6</i>	4
Função e via metabólica da família IRF	5
Estudos clínicos, genéticos e funcionais	6
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVO GERAL	12
4. OBJETIVO ESPECÍFICO	12
5. MÉTODO	13
Seleção e recrutamento de pacientes	13
Coleta, extração e armazenamento de DNA	14
Amplificação e sequenciamento do gene <i>IRF6</i>	14
Análise dos dados brutos e estatística	19
6. RESULTADO	20
7. DISCUSSÃO	25
8. CONCLUSÃO	29
9. REFERENCIAS	30
10. ANEXOS	35

INTRODUÇÃO

A fissura labiopalatal

A fissura labiopalatal (FLP) é uma malformação congênita de lábio e/ou cavidade oral. A gravidade da FLP é muito variável podendo levar a uma deformidade facial e disfunção oromotora (Mossey *et al*, 2009; Campbell *et al*, 2010). É a malformação craniofacial congênita mais comum no mundo (Jugessur *et al*, 2009). A FLP afeta cerca de 1 a cada 700 crianças nascidas, apresentando variantes de acordo com a origem geográfica e, étnica da população, além de influência de elementos ambientais e genéticos (Dixon *et al*, 2011). As FLP representam a quarta causa mais frequente de anomalias congênitas em recém-nascidos determinando a seus portadores um significativo impacto sobre a fala, audição e aparência, influenciando de modo prolongado e adverso a saúde e a integração social do mesmo. Há sugestão de fatores ambientais que influenciam no aparecimento deste fenótipo, porém o componente genético persiste ainda muito pouco conhecido (Dixon *et al*, 2011).

Estas malformações também podem fazer parte de um conjunto de sinais e sintomas sistêmico, e então são classificadas como sindrômicas. Quando são o único achado físico, são denominadas não-sindrômicas (FLP/NS). A maioria dos casos (70%) apresenta características não sindrômicas e neste caso a etiologia é mais heterogênea (Birbaum *et al*, 2009). As FLP/NS possuem etiologia multifatorial, onde existem componentes genéticos e ambientais (Birbaum *et al*, 2009). No que se refere ao componente genético desta multifatorialidade, alguns genes já foram associados ao possível desenvolvimento de FLP/NS, tais como *ABCA4* (*ATP Binding Cassette Subfamily A Member 4*), *BMP4* (*Bone Morphogenetic Protein 4*), *CRISPLD2* (*Cysteine Rich Secretory Protein LCCL Domain Containing 2*), *DLG1* (*Discs Large MAGUK Scaffold Protein 1*), *EPHA3* (*EPH Receptor A3*), *FGFR2* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*), *FOXE1* (*Forkhead Box E1*), *GREM1* (*Gremlin 1, DAN Family BMP Antagonist*), *IRF6* (*Interferon Regulatory Factor 6*), *MRPL53* (*Mitochondrial Ribosomal Protein L53*), *MEOX2* (*Mesenchyme Homeobox 2*), *MTHFR* (*Methylenetetrahydrofolate Reductase*), *MYH9* (*Myosin Heavy Chain 9*), *SPRY2* (*Sprouty RTK Signaling Antagonist 2*), *THADA*

(*Armadillo Repeat Containing*), *PAX7* (*Paired Box 7*), *WNT3* (*Wnt Family Member 3*), *WNT3A* (*Wnt Family Member 3^a*), etc. (Birbaum *et al.*, 2009; Leslie *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Rafighdoost *et al.*, 2017)

Os fatores ambientais para os quais há forte evidência de que possam aumentar o risco são: drogas, medicamentos, tabagismo, consumo de álcool durante a gravidez e deficiência de vitamina B ácido fólico (Leslie & Marazita, 2011). Dados sobre as anomalias craniofaciais na população brasileira estão crescendo a cada dia. A principal e mais abrangente fonte provém do Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC, 2016), o qual realiza a vigilância epidemiológica dessas condições em maternidades voluntárias. De acordo com o ECLAMC, a prevalência de FLP no Nordeste e Sul do Brasil varia entre 9,72-11,89/10 mil, enquanto no Sudeste, entre 5,39-9,71/10 mil. Segundo dados do Centro de atendimento integral ao fissurado (CAIF), a prevalência de FLP/NS no Paraná varia entre 0,19 a 1, 54:1.000 em recém-nascidos (CAIF, 2016).

Estudos do componente genético e etiológico das fissuras labiopalatais não sindrômicas

Os componentes etiológico e genético das FLP/NS permanecem mal caracterizados devido à sua heterogeneidade complexa (Liu, *et al.*, 2016). O risco de recorrência é calculado de forma empírica, baseado em estudos populacionais, variando de 4% a 10%, dependendo do sexo do indivíduo afetado, número de indivíduos afetados na família e relação de parentesco com o probando (Harper, 2004). No Brasil o risco de recorrência foi estimado em apenas 2% entre famílias com um parente em primeiro grau de um único indivíduo afetado (Brito *et al.*, 2011). Estudos genômicos demonstraram que o componente genético pode ter um caráter multigênico (Mangold *et al.*, 2011; Marazita *et al.*, 2012; Bureau *et al.*, 2014). Inúmeros genes foram identificados como potenciais fatores de risco e suas variantes causais já estabelecidas, porém a somatória deles não representa nem 20% dos casos de FLP/NS (Leslie *et al.*, 2016). Em doenças complexas, variantes raras podem exercer um grande efeito no risco dentro de uma família (Marazita *et al.*, 2004; Gibson, 2012). Diversos trabalhos do tipo Estudos de Associação de Todo

o Genoma (*Genome Wide Association Studies*, GWAS) revelaram diversos genes como potenciais fatores de risco (Ludwig *et al*, 2012; Beaty *et al.*, 2013)

Famílias Multiplex

O termo *multiplex* está relacionado a ocorrência de fissura em indivíduos com dois ou mais familiares de primeiro, segundo ou outro grau de parentesco e está associado a presença de variantes raras causais comuns àquela família (Beaty *et al*, 2012). Nestas famílias, há uma grande chance de os parentes afetados compartilharem uma mesma variante rara de alta penetrância (Cirulli & Goldstein, 2010; Wisjman, 2012). Além disso, existe a teoria de co-segregação dentro de famílias, demonstrada pela baixa taxa de recombinação ou pelo excesso de alelos compartilhados por familiares afetados (Bureau *et al*, 2014). Portanto, estudos com amostras de famílias *multiplex* podem ser até mesmo mais vantajosos na busca de variantes raras se comparados a estudos com amostras de indivíduos não relacionados entre si (Bureau *et al*, 2014).

Um estudo aplicou a análise de sequenciamento completo do exoma em 55 famílias *multiplex* com FLP/NS, com amostras de até dois ou três membros afetados por família. Neste estudo foi detectado a variante rara rs149253049 no gene *ADAMTS9* (ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif 9) compartilhado por parentes afetados em três famílias ($p= 0,02$) (Bureau *et al*, 2014). Projetos que investigam as bases genéticas de FLP/NS, como os apresentados acima, oferecem vantagens importantes para a identificação de genes que possam estar causando transtornos complexos e heterogêneos.

O gene *IRF6*

Uma região cromossômica associada à FLP/NS é a 1q32.2 (De Castro *et al*, 2001; Rodrigues *et al*, 2009, OMIM # 608864). Nesta região está localizado o gene *IRF6* (figura 2) que pertence a uma família de fatores de transcrição que partilham um domínio de ligação de DNA altamente conservado (De Castro *et al*, 2001). Estudos determinaram que o gene *IRF6* contém 9 exons e 2 isoformas (Kayano *et al*, 2003). A proteína IRF6 humana contém 517 aminoácidos (Matsuzawa *et al*, 2010).

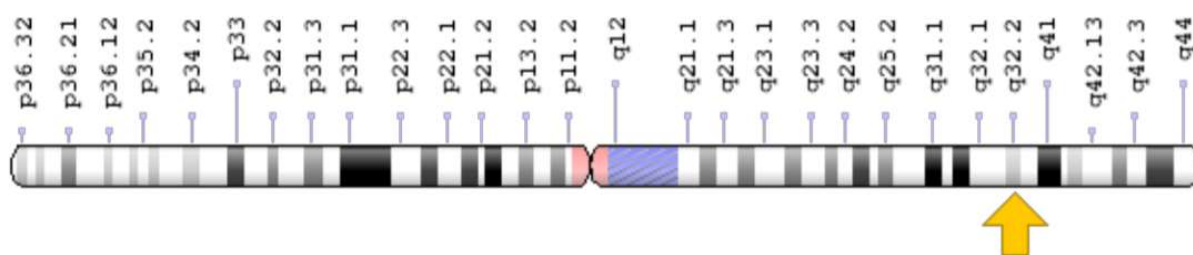


Figura 1- O gene *IRF6* está localizado no braço longo (q) do cromossomo 1 na posição 32.2 (NIH- Genetic Home Reference, 2018).

Função e via metabólica da família *IRF*

A família IRF desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro, regulando o sistema imune inato e / ou adaptativo (Honda & Taniguchi, 2006). Em contraste, o gene *IRF6* regula o desenvolvimento embrionário, incluindo a morfogênese orofacial, pele, membro, língua e cérebro, apresentando um grande papel na formação de fissuras labiopalatais (Leslie *et al*, 2016; Ingraham *et al*, 2006; Biggs *et al*, 2011; Aerts *et al*, 2013; Goudy *et al*, 2013). O gene *IRF6* é um regulador da proteína TGFB3 (Transforming Growth Factor Beta 3) na regulação da EMT (Transição Mesenquimal-Epitelial) e de apoptose durante a fusão palatal (Chen-Yeh Ke *et al*, 2015).

A TGFB3 regula positivamente a expressão de *IRF6* e aumenta a sua translocação nuclear, que, em seguida, altera a expressão de *SNAI2* (*Snail Family Transcriptional Repressor 2*) (Chen-Yeh Ke, *et al*, 2015). Esta mudança reprime a Placofilina e ZO-1 (*Zonula Occludens-1*) induzindo a EMT que é essencial para o processo de fusão palatal. Além disso o gene *IRF6* também atua para regulação da degradação da proteína Δ Np63 (*Transcription factor p63*), que irá resultar numa indução da expressão de p21 (Protein 21) e apoptose, sendo crucial para o processo de fusão palatal (Chen-Yeh Ke, *et al*, 2015) (figura 3).

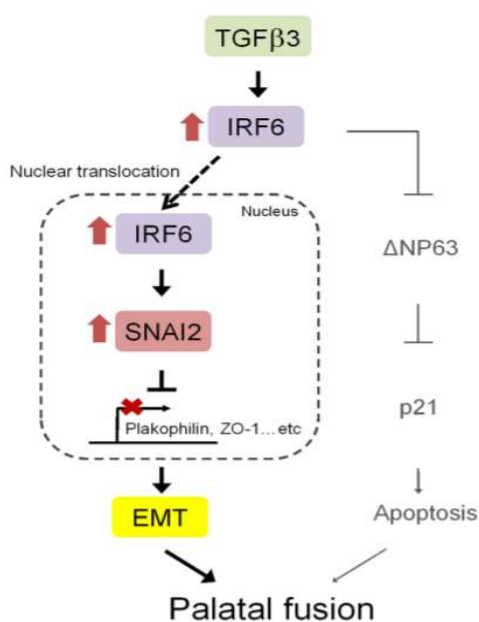


Figura 2- Via metabólica do gene *IRF6* e sua atuação na fusão palatal (Chen-Yeh Ke, *et al*, 2015)

Estudos clínicos, genéticos e funcionais

Estudos comprovam que variantes patogênicas no gene *IRF6* podem causar duas formas sindrômicas de FLP, a Síndrome de Van der Woude (SVW) (OMIM#119300) e Síndrome de Pterígio Poplíteo (SPP) (OMIM #607199). SVW é a forma mais comum de FLP sindrômica e tem herança autossômica dominante. SPP é um distúrbio com um fenótipo semelhante ao orofacial, porém, também inclui a anomalias na pele e genitais (OMIM#119500). Estudos mostraram altos níveis de RNAm de *IRF6* ao longo da borda medial de fusão do palato de fusão, germes dentários, folículos pilosos, genitália e pele (Ben *et al*, 2005). Outros estudos demonstraram que haploinsuficiência de *IRF6* interrompe o desenvolvimento orofacial e são consistentes com as mutações dominantes que modificam o desenvolvimento da pele e órgãos genitais (Ben *et al*, 2005). Apesar da associação bem reconhecida de variantes neste gene com formas sindrômicas de FLP, ainda há muito a ser estabelecido em relação as formas não sindrômicas.

Neste sentido, um estudo pioneiro foi realizado por Zuccherro *et al* 2004 revelando que variantes no gene *IRF6* podem ser responsáveis por um risco atribuível de fissura labial ou palatal de cerca de 12% para a contribuição genética nestes fenótipos e triplicou o risco de recorrência em famílias que já tinham uma criança afetada, sugerindo que este gene desempenha um papel substancial na causa de tais defeitos.

Blanton *et al* 2005 pesquisaram no gene *IRF6* os SNPs (*single nucleotide polymorphism*) rs1319435, rs2013162, rs2235375, rs2235543 em um grupo de indivíduos provenientes de 51 famílias *multiplex* com FLP/NS (43 eurodescendentes, 7 hispânicos, 1 afro-americano), 184 trios parentais (156 eurodescendentes, 28 hispânicos) e 21 trios pai, filho e mãe com história familiar positiva (17 eurodescendentes, 4 hispânicos) e também detectaram uma transmissão desequilibrada de alguns alelos do gene *IRF6*. Essa transmissão fortalece a hipótese de associação deste gene com o fenótipo de fissura oral, e sugere que *IRF6* desempenha um papel na susceptibilidade de FLP/NS. Wang e seu grupo realizaram uma meta-análise que incluiu 20 estudos sobre FLP/NS e concluíram que, no que se refere ao gene *IRF6*, o alelo A em rs2235371 gerou um risco significativamente diminuído (OR: 0,73, IC 95%: 0,61-0,88), enquanto o alelo A rs642961 gerou um risco significativamente aumentado de FLP/NS. Em rs987525, o alelo

A foi associado a um risco significativamente aumentado de FLP/NS, em comparação com o alelo C (PT: 1,71, IC 95%: 1,40-2,09) (Wang *et al*, 2012). Um estudo utilizando a metodologia de RT-PCR (Real time polimerase chain reaction) revelou que *IRF6* é amplamente expresso em tecidos embrionários de camundongos (Brito *et al*, 2012). A expressão alta de *IRF6* também foi detectada em folículos pilosos, rugas palatinas, germe de dente e ducto tireoglosso, genitália externa e na pele de todo o corpo (Kondo *et al*, 2002).

Em um estudo realizado por Paranaíba *et al* 2010 com o objetivo de determinar a associação dos polimorfismos rs2235371 e rs642961 no gene *IRF6* com FLP/NS em pacientes do estado do Paraná, 228 indivíduos afetados com FLP/NS e 126 indivíduos saudáveis foram genotipados. O genótipo polimórfico rs2235371 foi identificado em 10,1% dos pacientes com FLP/NS e em 10,3% do grupo controle, não revelando diferença estatística. Da mesma forma, a frequência de genótipos secundários rs642961 foi bastante semelhante entre o grupo controle (28,6%) e no grupo FLP/NS (25,4%), sem diferença significativa. Estes achados são consistentes com a falta de envolvimento dos polimorfismos rs2235371 e rs642961 *IRF6* na patogênese de FLP/NS na população brasileira.

Letra *et al* 2012 em seu estudo de associação dos genes *IRF6* e *TGFA* utilizaram o método *Taqman* para análises de casos-controle em 1.000 indivíduos brasileiros. Foram buscadas evidências de interação entre *IRF6* e *TGFA* testando se os marcadores associados à FLP foram sobre transmitidos juntos no conjunto de dados brasileiro de casos e nos conjuntos de dados familiares adicionais. Os genótipos para mais 142 tríades, pai, mãe e filho, originários do estudo colaborativo latino-americano de malformações congênitas (ECLAMC), 154 casos da Letônia e 8.717 indivíduos de várias coortes estavam disponíveis para a replicação de testes de interação. A expressão de *TGFA* e *IRF6* em estágios críticos durante a palatogênese foi analisada em camundongos com *knockout* de *IRF6*. Os marcadores em *IRF6* e *TGFA* foram associados com fissura labiopalatal na coorte brasileira ($p < 10^{-6}$). O gene *IRF6* também foi associado a fissura palatal com impactação de dentes permanentes ($p < 10^{-6}$). A evidência estatística de correlação entre *IRF6* e *TGFA* foi encontrada em todos os conjuntos de dados. O gene *TGFA* não foi expresso nos tecidos palatinos de ratos

com *knockout* de *IRF6*. Em conclusão, *IRF6* e *TGFA* contribuem para subconjuntos de FLP com anomalias dentárias específicas. Além disso, a interação *IRF6-TGFA* pode representar até 1% a 10% dos casos de FLP. O modelo *IRF6-knockout* ainda suporta a evidência de interação *IRF6-TGFA* encontrada em seres humanos.

Brito *et al* 2012 para testar o papel do *IRF6* na predisposição de FLP/NS na população brasileira, realizaram um estudo de associação estruturada com os polimorfismos rs642961 e rs590223 no gene *IRF6* em pacientes de cinco locais diferentes do país. Também avaliaram o efeito desses polimorfismos na expressão de *IRF6* em células estaminais mesenquimais (MSC). Foi observada a associação entre rs642961 em apenas fissurados labiais ($P = 0,009$; PT para genótipo AA = 1,83 [95% Intervalo de confiança (CI), 0,64-5,31]; PT para genótipo AG = 1,72 [95% CI, 1.03-2.84]). Esta associação parece ser conduzida pelos pacientes afetados de Barbalha, um local que apresenta a maior estimativa de herdabilidade ($H^2 = 0,85$) e o alelo A em Rs642961 estaria atuando através de um modelo dominante. Nenhuma associação foi detectada para o polimorfismo rs590223. Não foi encontrado correlação entre os níveis de expressão e os genótipos dos dois *loci*, e é possível que esses polimorfismos tenham um papel funcional em algum período específico da embriogênese.

Em um estudo realizado por Rego Borges *et al* 2015 foi avaliado a associação de 8 polimorfismos previamente identificados por estudos do genoma em outras populações com FLP/NS na população brasileira. Os polimorfismos rs560426, rs642961, rs1530300, rs987525, rs3758249, rs7078160, rs17085106 e rs13041247 foram genotipados em 293 pacientes brasileiros com FLP/NS e 352 controles não afetados. Cada amostra também foi genotipada para 40 marcadores polimórficos de inserção / supressão bialélica para caracterizar a ascendência genética. O histórico médio de ascendência africana foi de 31,1% para o grupo FLP/NS e 36,7% para o grupo controle. Após o ajuste para ancestralidade e testes múltiplos, os alelos rs3758249 (PT: 1,58, IC 95%: 1,25-2,01, $P = 0,0001$) e rs7078160 (PT: 1,59, IC 95%: 1,21-2,07, $P = 0,0002$) foram significativamente associados ao risco de FLP/NS. Os polimorfismos localizados em *IRF6* (rs642961) e 8q24 (rs1530300 e rs987525) mostraram associações marginais na população brasileira com ascendência africana elevada. Estes resultados indicam que rs3758249 em 9q22 e

rs7078160 em 10q25.3 representam *loci* de risco para FLP/NS na população brasileira com elevada ascendência africana.

Mais recentemente, em 2016 Leslie *et al* fizeram uma ampla investigação de variantes no gene *IRF6* em pacientes com FLP/NS. Foram analisados 1521 trios com FLP/NS para determinar a frequência de mutações no gene *IRF6*. Foram identificadas sete prováveis variantes patogênicas, embora uma avaliação posterior tenha identificado duas famílias com *SVW*. Não foi encontrada evidência de associação entre variantes raras em *IRF6* e FLP/NS. Em comparação com resultados de outros estudos similares (totalizando 2472 famílias), Leslie e colaboradores concluíram que as variantes patogênicas causais de *IRF6* são encontradas em 0,24-0,44% com famílias FLP/NS. Os mesmos sugerem que o rastreio clínico de mutação para *IRF6* seja considerado para certos padrões familiares, como famílias com tipos mistos de FLP e / ou transmissão autossômica dominante.

Souza *et al*, 2016 realizaram um estudo na população brasileira envolvendo 259 probandos e confirmaram a associação entre FLP/NS e variantes em *IRF6* (rs2235371, rs642961 e rs987525). Os indivíduos com fissura oral (fissura labial, palato labial e palatal) e seus pais foram selecionados de diferentes regiões geográficas do Brasil. Os polimorfismos foram genotipados e a ascendência genômica foi estimada usando um painel de 48 polimorfismos. O teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) detectou o excesso de transmissão do alelo G em rs2235371 ($P = 0,0008$) na amostra total. Uma associação significativa deste alelo também foi observada no grupo de fissura labiopalatal ($P = 0,0343$) e fissura labiopalatal + labial ($P = 0,0027$). A análise de haplotipos em *IRF6* mostrou que o haplotipo G/A aumentou o risco de fissura em crianças (dose única: $P = 0,0038$, dose dupla: $P = 0,0022$) e nas mães (dose única: $P = 0,0016$). O polimorfismo rs987525 também exibiu uma associação entre o alelo A e fissura palatolabial + labial ($P = 0,0462$). Estes resultados foram confirmados nos probandos com ascendência europeia. Em conclusão, segundo os autores, o polimorfismo rs987525 desempenha um papel em fissura labiopalatal e o haplotipo G / A (rs2235371 / rs642961) aumentando o risco de fissura oral na população brasileira.

Fakhouri *et al* 2017 realizaram um estudo do mecanismo de ação e interação dos genes *IRF6* e *TWIST1* em ratos durante a formação craniofacial. Enquanto os ratos heterozigóticos eram normais, os embriões heterozigotos duplos (*IRF6* +/-, *TWIST1* +/-) podem apresentar hipoplasia mandibular grave que leva a agnatia e fenda palatina ao nascer. A análise da expressão espaçotemporal demonstrou que *IRF6* e *TWIST1* são encontrados em diferentes tipos de células. Em consonância com a interação intercelular, foi descoberto que a expressão reduzida de Endotelina1 (EDN1) na mandíbula e fatores de transcrição que são críticos para o padrão mandibular incluindo *DLX5*, *DLX6* e *HAND2*, também foram reduzidos nas células mesenquimais. Considerando que variantes em *IRF6* e *TWIST1* contribuem para defeitos craniofaciais humanos, essa interação gene-gene pode ter implicações em distúrbios craniofaciais (Fakhouri *et al*, 2017)

Sanchez *et al* 2017 realizaram um trabalho para fornecer uma visão mais aprofundada sobre o papel do *IRF6* na patogênese de FLP. Neste trabalho procurou-se identificar os interagentes diretos da proteína IRF6 usando uma combinação de 2 híbridos de levedura e ensaios de co-imunoprecipitação. Usando essa abordagem, foi identificado NME1 e NME2, reguladores bem conhecidos de GTPases de tipo Rho, endocitose de E-caderina e remodelação de junção epitelial, como proteínas parceiras de *IRF6*. As proteínas NME co-localizam-se com IRF6 no citoplasma de células epiteliais palatais primárias *in vivo* e sua interação com IRF6 é significativamente aumentada pela fosforilação de resíduos de serina chave no terminal C IRF6. Além disso, as mutações *IRF6 missense* associadas a FLP interrompem a capacidade do mesmo para ativar as proteínas NME e resultar em ativação elevada de Rac1 e RhoA, em comparação com o *IRF6* normal, quando expresso ectopicamente em células epiteliais 293T. Também foi relatado a identificação de 2 mutações *missense* nas proteínas NME em pacientes com FLP (NME1 R18Q EM IRF6 e GRHL3 com mutação negativa com síndrome de van der Woude em um paciente e NME2 G71V em paciente um com FLP não sindrômico). Ambas as variantes interromperam a capacidade das respectivas proteínas para interagir com IRF6. Os dados apresentados sugerem um papel importante para o *IRF6* citoplasmático na regulação da disponibilidade ou localização do complexo NME1 / 2 e,

portanto, do comportamento dinâmico do epitélio durante o desenvolvimento labial / palatal (Sanchez *et al.*, 2017).

Kousa *et al* 2017 realizaram um estudo nos genes *IRF6*, *CHUK (IKKA)* e *RIPK4* e ressaltaram que mutações nestes genes podem levar a um espectro de doenças que inclui malformações cutâneas, de membros e craniofaciais. Foi comprovado o resgate genético parcial de embriões após o *knocout* de *IRF6* usando o promotor KRT14 para dirigir a expressão de *IRF6* no epitélio basal. Em contraste com os embriões com *knockout* de *IRF6*, os embriões normais sobrevivem ao período perinatal imediato. O exame macroscópico revelou o resgate das adesões da pele entre o esqueleto axial e o esqueleto apendicular. Inesperadamente, a expressão de *IRF6* orientada para o KRT14 não resgatou completamente as fissuras orofaciais e as adesões entre o palato e a língua, sugerindo a importância da expressão de *IRF6*. Igualmente aos embriões com *knockout*, os embriões de resgate *IRF6* também têm adesões persistentes de esôfago, o que provavelmente contribuiu para a morte pós-natal. Juntos, esses dados sugerem que a expressão direcionada do *IRF6* pode reduzir significativamente a gravidade da doença, mas que um nível mínimo de *IRF6* nas células epiteliais basais é necessário para o desenvolvimento orofacial. Portanto, os fenótipos homólogos humanos e de ratos foram observados para *IRF6*, *IKKA* e *RIPK4*. Este trabalho, mostrou que alterações no nível de expressão de *IRF6* modifica dramaticamente este fenótipo no útero (Kousa, *et al*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

O gene *IRF6* apresenta-se como um gene importante a ser analisado, visto que já foi associado ao desenvolvimento de FLP/NS em outras populações e existem fortes evidências de que alterações na sua expressão poderiam propiciar o acometimento de fissuras. De cerca de 20 genes já associados com fissuras, apenas dois tem explicação embriológica e fisiopatológica para o acometimento de fissura, um deles é o *IRF6*. Além da ampliação do estudo da etiologia, distribuição e variabilidade de polimorfismos no gene *IRF6* em pacientes do estado do Paraná, o presente estudo pretende ajudar a compreender se existem diferenças em indivíduos afetados pertencentes a famílias *multiplex*, no que se refere a variantes no gene *IRF6*.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar a existência da correlação entre possíveis variantes genéticas no gene *IRF6* e o fenótipo de FLP/NS, em pacientes do estado do Paraná oriundos de famílias *multiplex*.

4. OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar as frequências alélicas e genotípicas do gene *IRF6* em amostras de pacientes com FLP/NS do estado do Paraná oriundos de famílias *multiplex*.

5. MÉTODOS

Seleção e recrutamento dos pacientes

Este projeto foi aprovado pelo CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) sob protocolo: 45463615.4.0000.0020. Os pacientes com fissuras labiopalatais não sindrômicas foram recrutados com o auxílio da instituição coparticipante, o Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Lábio Palatal (CAIF), situado em Curitiba-PR, que é o centro de referência para atendimento aos pacientes com deformidade craniofaciais no Paraná há 24 anos e até o momento atendeu cerca de 8000 pacientes com deformidades craniofaciais (CAIF, 2016). Todos os pacientes ou seus representantes legais leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

O CAIF disponibilizou o acesso aos prontuários com os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes. Foram selecionados pacientes residentes no estado do Paraná que se incluíam na definição de FLP/NS. Os pacientes já haviam sido previamente classificados por uma mesma médica geneticista. Baseado na hipótese de que em casos familiares o componente genético deve ser mais importante, foram incluídos pacientes única e exclusivamente com histórico familiar de parentes com fissuras lábio palatais não sindrômicas, considerando-se parentes como parentesco em I grau (pais, irmãos e filhos), II grau (tios, sobrinhos, avós e meios-irmãos) e III grau (primos em primeiro grau). Foram excluídos os pacientes com casos sindrômicos e pacientes sem histórico familiar. Sendo assim, incluímos neste estudo 33 pacientes de famílias independentes, com histórico médico completo no CAIF, residentes do estado do Paraná, totalizando 33 amostras (Tabela Suplementar 1).

Coleta, extração e armazenamento de DNA

Foram utilizados instrumentos específicos para coleta de sangue periférico (seringas, tubo EDTA e EPI's). Após a coleta o DNA foi extraído utilizando o KIT Universal *Zymo*, de acordo com as instruções do fornecedor (Zymo Research Corp, CA-USA). As amostras foram quantificadas após a extração de DNA utilizando o equipamento *Nano Drop 2000* (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA). Todas as amostras selecionadas para este projeto possuíram no mínimo 50 ng/uL de DNA. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C, para ser posteriormente utilizado.

Amplificação e sequenciamento do gene *IRF6*

O DNA extraído foi submetido ao processo de amplificação por meio técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o reagente *GoTaq Master Mix 2X* (pH 8,5) composto por: dATP 400 uM, dGTP 400 uM, dCTP 400 uM, dTTP 400 uM e MgCl₂ 3 mM (*Promega, Madison, WI*). A quantidade de DNA utilizada para cada reação foi de 20 ng. O procedimento de amplificação consistiu de um passo de desnaturação inicial a 94 °C (3') seguido por ciclos de 3 fases: desnaturação do DNA (94 °C - 30''), hibridação dos iniciadores específicos para a região alvo (variando de 60 a 62 °C - 30'') e a extensão pela *Taq* polimerase (72 °C - 1'). Estes ciclos foram repetidos 40 vezes em cada reação de amplificação e, após a finalização dos ciclos, um passo adicional de extensão (72 °C - 10') foi realizado. Para estas amplificações foram desenhados e utilizados 10 pares de primers, referentes aos 9 exons da principal isoforma e ao único exon da isoforma 2 não presente na principal isoforma do gene *IRF6*. As sequências e condições de amplificação podem ser observadas na tabela 2. Foram amplificadas todas as regiões codificadoras, as regiões UTR 5' e 3' e pelo menos 40 pares de bases de regiões intrônicas flanqueando os exons de todas as isoformas do gene *IRF6*.

Tabela 1- Sequências de *primers* e condições de amplificação.

Exon	Primer F	Primer R	Tamanho (Bp)	Temperatura de anelamento (°C)
1	ggcaggtaagggtggtg	ccccaagcaagttctctcac	257	62
2	gagacgtgttctcagccttg	accacatgatgaggagaa	237	61
3	ccagtggctggcctaattct	aaaatccagaaaggctgatgg	271	62
4	ggtaagcacatgcttgacag	tcttaagagtgagccagaa	334	61
5	gggctagcagtcctagctt	tgacagtccaagggtcaaaa	291	61
6	tctcagagcatcagcaagtga	gaaagcaggacaggaaagagtc	297	60
7	tgaatgctggttgaaagggtg	gcaggaagggtgaaagacagg	586	60
8	cagcataaaagatggtattgtga	ggcttaagcattggcaaaaa	250	61
9	aatcttgggtccattgtgct	gagaaaagagagatttaaaagctggt	397	60
ISO2*	atttcttgcaactcgccaat	gcaagttctctcaccccta	397	60

*Primers referentes ao exon 1 da isoforma 2, que seria a única região desta isoforma não presente na isoforma principal do gene *IRF6*.

Após a confirmação do sucesso da amplificação em gel de agarose a 1%, os produtos de PCR (*amplicons*) relativos a cada segmento para cada paciente foram misturados em um único tubo (realização de um *pool*) e quantificados no equipamento Quibit 2.0 (*Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA*). Cada *pool* contendo amostras de pacientes diferentes foi preparado para o sequenciamento de nova geração utilizando o *Nextera DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, California, EUA)* de acordo com o protocolo fornecido pela fabricante. Em resumo o processo constitui-se da Tagmentação de DNA, amplificação da biblioteca, lavagem da Biblioteca, padronização da Biblioteca e finalização do *pool* da Biblioteca.

O sequenciamento de nova geração foi realizado no equipamento *Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, California, EUA)* onde cada amplicon foi sequenciado pela tecnologia de síntese em um kit Nextera V2, conforme protocolo citado a seguir. O software utilizado para alinhamento dos dados brutos foi *IGV- Integrative Genomics Viewer*.

Nextera- Sequenciamento de 2ª geração.

O protocolo Nextera utiliza a tecnologia de transposomo para fragmentar e inserir *tags* no DNA, acrescentando sequencias adaptadoras exclusivas ao processo. Uma reação de PCR com ciclagem limitada utiliza as sequencias adaptadoras para amplificar o DNA inserido. A reação de PCR também adiciona sequências indicadoras (código de barras) em ambas as extremidades do DNA, permitindo assim o sequenciamento do *pool* de bibliotecas em qualquer Sistema de Sequenciamento Illumina.

Quantificação do DNA

O protocolo Nextera utiliza 1,5ng/uL de DNA genômico. O material deve ser inicialmente quantificado por uma metodologia fluorométrica específica para a quantificação de DNA dupla fita, tal como o sistema *Qubit*.

Tagmentação do DNA

Nesta etapa o DNA foi marcado e fragmentado pelo transposomo. Esta enzima simultaneamente fragmenta e adiciona sequencias de adaptadores no final da sequência de DNA, permitindo à amplificação por PCR na etapa seguinte. Os materiais utilizados nesta etapa foram: TDE1 (Illumina Nextera), *Reagent KitTD- Tagment DNA Buffer* (Illumina Nextera Reagent Kit), DNA inicial (1,5 ng/μl) e Placa de 96 poços.

Os procedimentos utilizados para esta etapa foram: adicionados 6,25 μl do tampão TD em cada poço, adicionados 5 μl de DNA a 1.5 ng/μl em cada poço de amostra, misturado 1 μl do mix TDE1 em cada poço contendo DNA e tampão TD, misturado gentilmente com a ponteira cerca de 5 vezes, coberto a placa com selo e centrifugada a 280 rpm por 1 minuto e posteriormente a placa foi inserida no termociclador com o seguinte programa, 55°C por 5 minutos, 95°C por 5 minutos e estabilização a 10°C.

1ª Purificação

Nesta etapa foram utilizados *Beads AMPure XP* para purificar a biblioteca de DNA selecionando apenas os fragmentos maiores, removendo os de menor tamanho e o excesso de enzima para não afetar as reações seguintes. Os materiais utilizados nesta etapa foram: *RSB (Resuspension Buffer- Illumina Nextera Reagent Kit)*, *AMPure XP beads* e Etanol 80%. A placa de amplificação foi centrifugada 2800 rpm por 1 min para retirada do material condensado, foi agitada em Vortex por 30`` para assegurar que as esferas estiveram uniformemente misturadas, foram adicionados 22,5 µl das *Beads AMPure XP* em cada poço da placa, a mesma foi selada, agitada em vórtex, centrifugada brevemente, incubada em temperatura ambiente sem agitar por 5 minutos, colocada sobre um suporte magnético durante 2`. Com a placa no suporte magnético, o sobrenadante foi removido. Após esta etapa, as beads foram lavadas com etanol fresco 80% como segue: 200 µl de etanol 80% em cada poço de amostra. A placa foi mantida sobre o suporte magnético por 30``, após isso, foi removido e descartado o sobrenadante. A placa então foi removida do suporte magnético e adicionados 8µl de *RSB* em cada poço, o produto foi homogeneizando em vórtex (com velocidade média baixa) e centrifugado brevemente. A placa foi novamente colocada sobre o suporte magnético por 2` e foram transferidos 5µl do sobrenadante para uma nova placa.

Indexação da amostra por PCR

Nesta etapa, o DNA é *tagmentado* (marcado), purificado e amplificado por um programa de PCR. Esta etapa de PCR também adiciona os index 1 (i7), index 2 (i5) e complementa a sequência dos adaptadores comuns S5 e N7 necessários para geração de *clusters*. Os materiais utilizados para esta etapa: *NPM (Nextera PCR Master Mix- Illumina Nextera Reagent Kit)*, *Index 1 primers N7XX- 1 tubo (index Illumina Nextera XT Index Kit)*, *Index 2 primers S5XX- 1 tubo (index Illumina Nextera XT Index Kit)*, *Primer Cocktail (Illumina Nextera Reagent Kit)*.

Os procedimentos realizados para esta etapa: Foram adicionados 4 µl do *master mix* NPM em cada poço na placa com o material já previamente purificado e eluído com 5 uL de amostra, adicionado 1 µl dos primers *index 1* e 1 µl dos primers *index 2*, adicionado 1 uL de *Primer Cocktail* em cada poço. Posteriormente a placa foi selada e centrifugada a 2800 rpm por 1 minuto. A placa de PCR foi inserida no termociclador utilizando o seguinte programa (72°C por 3', 98°C por 30'', 9 ciclos de - 98°C por 10 segundos, - 63°C por 30'', - 72°C por 60'', Extensão final de - 72°C por 5' e estabilização a 10°C).

2ª Purificação

Nesta etapa foram utilizados *Beads AMPure XP* para purificar a biblioteca de DNA selecionando apenas os fragmentos maiores, removendo os de menor tamanho e o excesso de enzima para não afetar as reações seguintes e o excesso de adaptadores não utilizados na reação. Os materiais utilizados: *RSB (Resuspension Buffer- Illumina Nextera Reagent Kit)*, *AMPure XP beads* e Etanol 80%.

A placa de amplificação foi centrifugada a 2800 rpm por 1' para retirada do material condensado, agitada em Vortex por 30'' para assegurar que as *Beads* estavam uniformemente misturadas, foi então adicionado 22,5 µl (1,5x o volume da reação) das *beads AMPure XP* em cada poço, a placa foi selada, agitada em vórtex (com velocidade média baixa) e centrifugada brevemente. A placa foi incubada em temperatura ambiente sem agitar por 5', colocada sobre um suporte magnético durante 2' e cuidadosamente, sobre a placa magnética, o sobrenadante foi removido e descartado. Com a placa ainda sobre o suporte magnético, as *beads* foram lavadas com etanol fresco 80%.

Preparo das amostras para carregamento no sequenciador

As bibliotecas foram quantificadas por fluorômetro (*Qubit*). A quantificação esperada pode variar de 0,5ng/uL até aproximadamente 20ng/uL. O esperado aproximado de uma reação de boa qualidade é de 6ng/uL.

A diluição deve ser feita baseada no tamanho dos fragmentos esperados versus a quantificação individual de cada amostra. O tamanho do fragmento esperado para essa preparação de amostra é de 470 pares de base aproximados. Depois de estabelecido o tamanho da biblioteca e quantidade de massa em ng, foi realizada a conversão para molaridade. As bibliotecas foram diluídas para 2 nM com a solução preparada a base de *SSP 10X* e *Tween 50X*. A diluição fez com que a amostra estivesse em 10 pM e pronta para ser adicionada ao cartucho. Na presença de mais de uma amostra preparada, estas devem ser analisadas com a quantidade de exons e genes presentes em cada biblioteca. O volume final de cada amostra foi equivalente a quantidade de amostras carregadas no equipamento, sendo que o volume do *pool* final foi de 600 uL. Foram adicionados 10 uL de *PHIX* a 8pM, a solução foi misturada em vórtex, centrifugada brevemente e em seguida foram carregadas no cartucho de reagentes do Sequenciador *MiSeq* (*Illumina*).

Análise dos dados brutos e estatística

As sequências produzidas foram convertidas em arquivos no formato *FastQ*, *bam/bai* e *vcf*. Todas as variantes foram analisadas *in silico* pelos softwares *Alamut* e *Mutation taster* que são compostos pelos programas *SpliceSiteFinder-like*, *MaxEntScan*, *NNSPLICE*, *GeneSplicer* para análise de *splicing* e *Align GVGD*, *SIFT*, *PolyPhen-2* e *KD4v* para variantes *missence*. Estes dados foram utilizados em estudo comparativo entre os pacientes e os bancos de dados populacionais *1000 Genomes Project* que realizou o estudo do genoma completo de 2.504 indivíduos de 26 populações diferentes (1000G), gnomAD que centralizou mais de 123.100 variantes oriundas do sequenciamento completo do exoma de 15.496 variantes oriundas do sequenciamento completo do genoma (gnomAD) e Arquivo Brasileiro Online de mutações (AbraOM) que

realizou o sequenciamento do exoma de 609 indivíduos idosos do Brasil em busca de variações genéticas. Todos os dados foram comparados com indivíduos não afetados com FLP/NS.

Todos os resultados foram tabulados e submetidos a análise de variância, χ^2 Valor de P e frequência alélica mínima (MAF) utilizando o programa GraphPad. Os dados populacionais das frequências Europeia Não Finlandesa, Africana, Leste Asiática e Latina foram extraídos do banco de dados online *gnomAD* e as frequências da população Brasileira foram extraídas do banco de dados *AbraOM*, todos os dados foram comparados com pacientes não afetados por FLP/NS.

5. Resultados

Um total de 33 pacientes foram investigados neste trabalho. As informações relativas a características clínicas, sexo, e regionalidade foram tabulados e estão apresentados na tabela suplementar 1. Foram sequenciados 19 indivíduos do sexo masculino e 14 do sexo feminino, que tinham características clínicas de FLP/NS. Após o sequenciamento completo do gene *IRF6* foram obtidos um total de 25 variantes e seus genótipos estão descritos na tabela 3.

Na tabela 3 estão apresentadas a frequência alélica mínima e frequência das variantes encontradas em nosso estudo. Os destaques desta tabela são a detecção das variantes g.4646_4647insCCTAA e g.17743T>C por ainda não terem sido descritas nos bancos de dados genéticos *Varsome*, *Clinvar*, HGMD e *Abraom* utilizando o genoma de referência *hg19* para comparação, possuírem *MAF* e frequência estatística (P) significativa nas populações Africana, Latina, Europeia não Finlandesa, Leste Asiática e Brasileira em indivíduos não afetados ($p < 0,0001$) e serem previstas como possivelmente patogênicas no programa de análise *in silico* Mutation Taster.

Tabela 2: Descrição das variantes e genótipo identificados na amostra analisada através da contagem alélica

gDNA	cDNA	Região codificante	ID	Amostras (33)		
				AA*	AB	BB
g.10617_10618insGGACTGCTAGCC	N/D	N/D	N/D	30	3	0
g.16265T>A	c.776-71T>A	N/D	N/D	32	1	0
g.16266A>C	c.776-70A>G	N/D	N/D	32	1	0
g.16268_16269insTGCTG	N/D	N/D	N/D	28	5	0
g.16269_16270insCCTACTTTT	N/D	N/D	N/D	28	5	0
g.17743T>C	cDNA.1619T>C	N/D	N/D	32	1	0
g.278T>A	N/D	N/D	N/D	32	1	0
g.3972G>T	N/D	N/D	N/D	29	3	1
g.3974_3975insCCTTC	N/D	N/D	N/D	32	1	0
g.3974G>T	N/D	N/D	N/D	32	1	0
g.3996T>G	N/D	N/D	N/D	32	1	0
g.3997C>A	N/D	N/D	N/D	32	1	0
g.3999C>A	N/D	N/D	N/D	32	1	0
g.4001_4001delA	N/D	N/D	N/D	32	1	0
g.4646_4647insCCTAA	N/D	N/D	N/D	32	0	1
g.209806173T>A	c.-302A>T	N/D	rs12403006	23	9	1
g.209802064dup	c.-75-18dupC	N/D	rs145034080	30	3	0
g.209795339C>A	c.459G>T	N/D	rs2013162	15	14	4
g.209790735C>T	c.820G>A	p.Val274Ile	rs2235371	32	1	0
g.209790458G>A	c.1060+37C>T	N/D	rs2235373	25	8	0
g.209792242G>A	c.667+27C>T	N/D	rs2235375	17	13	3
g.209802047T>C	c.-75-4A>G	N/D	rs2235377	31	2	0
g.209795408C>A	c.390G>T	N/D	rs34907424	31	2	0
g.209796557G>C	c.175-5C>G	N/D	rs7552506	17	13	3
g.209802041A>G	c.-73T>C	N/D	rs861019	8	21	4

ID – Identificação da variante, quando existente. *AA / AB / BB representam os genótipos possíveis para cada determinada variante sendo o “alelo” A o tido como comum nas populações presentes nos bancos de dados e o “alelo B” a variante alternativa.

N/D- Informação não disponível nos bancos de dados ou variante não encontrada no grupo amostral específico.

Tabela 3: MAF e valor de P das variantes encontradas na amostra analisada comparadas com populações distintas.

gDNA	ID	Frequência Europeia Não Finlandesa (gnomAD)	Amostra Geral (33)		gDNA	ID	Frequência Brasileira (AbraOM)	Amostra Geral (33)	
			MAF	P				MAF	P
g.10617_10618insGGACTGCTAGCC	N/D	N/D	0.0454	<0,0001	g.10617_10618insGGACTGCTAGCC	N/D	N/D	0.0454	<0,0001
g.16265T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.16265T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.17743T>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.17743T>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.16266A>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.16266A>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.16268_16269insTGCTG	N/D	N/D	0.0757	<0,0001	g.16268_16269insTGCTG	N/D	N/D	0.0757	<0,0001
g.16269_16270insCCTACTTTT	N/D	N/D	0.0757	<0,0001	g.16269_16270insCCTACTTTT	N/D	N/D	0.0757	<0,0001
g.278T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.278T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3972G>T	N/D	N/D	0.0757	<0,0001	g.3972G>T	N/D	N/D	0.0757	<0,0001
g.3974_3975insCCTTC	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3974_3975insCCTTC	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3974G>T	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3974G>T	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3996T>G	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3996T>G	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3997C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3997C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3999C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3999C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.4001_4001delA	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.4001_4001delA	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.4646_4647insCCTAA	N/D	N/D	0.0303	<0,0001	g.4646_4647insCCTAA	N/D	N/D	0.0303	<0,0001
g.209806173T>A	rs12403006	0.2208	0.1666	<0,0001	g.209806173T>A	rs12403006	0,15528	0.1666	0,8065
g.209802064dup	rs145034080	0.00006669	0.0454	<0,0001	g.209802064dup	rs145034080	N/D	0.0454	N/D
g.209795339C>A	rs2013162	0.3727	0.3333	0.5071	g.209795339C>A	rs2013162	0,369458	0.3333	0,5541
g.209790735C>T	rs2235371	0.01448	0.0151	0.639	g.209790735C>T	rs2235371	0,052545	0.0151	0,2878
g.209790458G>A	rs2235373	0.1755	0.1212	0.2733	g.209790458G>A	rs2235373	0,220854	0.1212	0,0554
g.209792242G>A	rs2235375	0.000008964	0.2878	<0,0001	g.209792242G>A	rs2235375	0,370279	0.2878	0,1761
g.209802047T>C	rs2235377	0.01334	0.0303	0.5121	g.209802047T>C	rs2235377	0,042017	0.0303	0,9203
g.209795408C>A	rs34907424	0.0002507	0.3030	<0,0001	g.209795408C>A	rs34907424	0,013957	0.3030	0,5839
g.209796557G>C	rs7552506	0.3576	0.2727	0.1502	g.209796557G>C	rs7552506	0.316913	0.2727	0.4503
g.209802041A>G	rs861019	0.4313	0.4393	0.8875	g.209802041A>G	rs861019	0,37395	0.4393	0,3349

MAF – Frequência alelica mínima

N/D- Informação não disponível no banco de dados.

Tabela 3 Continuação: MAF e valor de P das variantes encontradas na amostra analisada comparadas com populações distintas.

gDNA	ID	Frequência Europeia Não Finlandesa (gnomAD)	Amostra Geral (33)		gDNA	ID	Frequência Latina (gnomAD)	Amostra Geral (33)	
			MAF	P				MAF	P
g.10617_10618insGGACTGCTAGCC	N/D	N/D	0.0454	<0,0001	g.10617_10618insGGACTGCTAGCC	N/D	N/D	0.0454	<0,0001
g.16265T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.16265T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.17743T>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.17743T>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.16266A>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.16266A>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.16268_16269insTGCTG	N/D	N/D	0.0757	<0,0001	g.16268_16269insTGCTG	N/D	N/D	0.0757	<0,0001
g.16269_16270insCCTACTTTT	N/D	N/D	0.0757	<0,0001	g.16269_16270insCCTACTTTT	N/D	N/D	0.0757	<0,0001
g.278T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.278T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3972G>T	N/D	N/D	0.0757	<0,0001	g.3972G>T	N/D	N/D	0.0757	<0,0001
g.3974_3975insCCTTC	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3974_3975insCCTTC	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3974G>T	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3974G>T	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3996T>G	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3996T>G	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3997C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3997C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3999C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3999C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.4001_4001delA	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.4001_4001delA	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.4646_4647insCCTAA	N/D	N/D	0.0303	<0,0001	g.4646_4647insCCTAA	N/D	N/D	0.0303	<0,0001
g.209806173T>A	rs12403006	0.2208	0.1666	<0,0001	g.209806173T>A	rs12403006	0,2136	0.1666	0,3681
g.209802064dup	rs145034080	0.00006669	0.0454	<0,0001	g.209802064dup	rs145034080	0,002387	0.0454	0,0002
g.209795339C>A	rs2013162	0.3727	0.3333	0.5071	g.209795339C>A	rs2013162	0,0002387	0.3333	<0,0001
g.209790735C>T	rs2235371	0.01448	0.0151	0.639	g.209790735C>T	rs2235371	0,2041	0.0151	0,0002
g.209790458G>A	rs2235373	0.1755	0.1212	0.2733	g.209790458G>A	rs2235373	0,3019	0.1212	<0,0001
g.209792242G>A	rs2235375	0.000008964	0.2878	<0,0001	g.209792242G>A	rs2235375	0	0.2878	<0,0001
g.209802047T>C	rs2235377	0.01334	0.0303	0.5121	g.209802047T>C	rs2235377	0,02041	0.0303	<0,0001
g.209795408C>A	rs34907424	0.0002507	0.3030	<0,0001	g.209795408C>A	rs34907424	0,0007159	0.3030	0,2117
g.209796557G>C	rs7552506	0.3576	0.2727	0.1502	g.209796557G>C	rs7552506	0,3074	0.2727	0,5541
g.209802041A>G	rs861019	0.4313	0.4393	0.8875	g.209802041A>G	rs861019	0,2842	0.4393	0,0112

MAF – frequência alelica mínima

N/D- Informação não disponível no banco de dados.

Tabela 3 Continuação: MAF e valor de P das variantes encontradas na amostra analisada comparadas com populações distintas.

gDNA	ID	Frequência Africana (gnomAD)	Amostra Geral (33)		gDNA	ID	Frequência Leste Asiática (gnomAD)	Amostra Geral (33)	
			MAF	P				MAF	P
g.10617_10618insGGACTGCTAGCC	N/D	N/D	0.0454	<0,0001	g.10617_10618insGGACTGCTAGCC	N/D	N/D	0.0454	<0,0001
g.16265T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.16265T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.17743T>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.17743T>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.16266A>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.16266A>C	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.16268_16269insTGCTG	N/D	N/D	0.0757	<0,0001	g.16268_16269insTGCTG	N/D	N/D	0.0757	<0,0001
g.16269_16270insCCTACTTTT	N/D	N/D	0.0757	<0,0001	g.16269_16270insCCTACTTTT	N/D	N/D	0.0757	<0,0001
g.278T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.278T>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3972G>T	N/D	N/D	0.0757	<0,0001	g.3972G>T	N/D	N/D	0.0757	<0,0001
g.3974_3975insCCTTC	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3974_3975insCCTTC	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3974G>T	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3974G>T	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3996T>G	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3996T>G	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3997C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3997C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.3999C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.3999C>A	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.4001_4001delA	N/D	N/D	0.0151	<0,0001	g.4001_4001delA	N/D	N/D	0.0151	<0,0001
g.4646_4647insCCTAA	N/D	N/D	0.0303	<0,0001	g.4646_4647insCCTAA	N/D	N/D	0.0303	<0,0001
g.209806173T>A	rs12403006	0.04417	0.1666	<0,0001	g.209806173T>A	rs12403006	0,07829	0.1666	0,0193
g.209802064dup	rs145034080	0,02166	0.0454	0,4543	g.209802064dup	rs145034080	0,07829	0.0454	0,4543
g.209795339C>A	rs2013162	0,2733	0.3333	0,2753	g.209795339C>A	rs2013162	0,5602	0.3333	0,0003
g.209790735C>T	rs2235371	0,005841	0.0151	0,8625	g.209790735C>T	rs2235371	0,5602	0.0151	<0,0001
g.209790458G>A	rs2235373	0,2283	0.1212	0,0388	g.209790458G>A	rs2235373	0,4753	0.1212	<0,0001
g.209792242G>A	rs2235375	0	0.2878	<0,0001	g.209792242G>A	rs2235375	0	0.2878	<0,0001
g.209802047T>C	rs2235377	0,005845	0.0303	0,0788	g.209802047T>C	rs2235377	0,04184	0.0303	<0,0001
g.209795408C>A	rs34907424	0,06201	0.3030	0,4166	g.209795408C>A	rs34907424	0	0.3030	<0,0001
g.209796557G>C	rs7552506	0,2673	0.2727	0,9203	g.209796557G>C	rs7552506	0,1422	0.2727	0,0058
g.209802041A>G	rs861019	0,5038	0.4393	0,2655	g.209802041A>G	rs861019	0,2376	0.4393	0,0002

MAF – frequência alelica mínima.

N/D- Informação não disponível no banco de dados.

6. Discussão

Por ser uma anomalia congênita frequente e de grande impacto médico-social, e pelo limitado conhecimento de sua etiologia, apesar dos enormes avanços no conhecimento da genética humana nas últimas décadas, a procura por fatores genéticos e/ou ambientais que tragam uma resposta tangível a ocorrência da fissura labiopalatal não sindrômica na população brasileira e mundial é cada dia maior. Um fator sempre considerável ao realizar-se estudos na população brasileira é a vasta mistura étnica ocorrida devido a grandes migrações e colonizações ao longo da história do país. Existe uma grande influência Europeia nas regiões sudeste e sul do Brasil (89%) enquanto a predominância Africana é localizada na região nordeste (30%) e a Ameríndia é prevalente no Norte (19%) (Salzano & Sans, 2014). Importante então considerar que o presente estudo teve como base a população Sul brasileira, especificamente na cidade de Curitiba e Região Metropolitana do estado do Paraná.

Variante rs861019

É evidente que certas variantes comuns no gene *IRF6* estão associadas a FLP/NS e, devido ao desequilíbrio da ligação, podem apontar para variantes etiológicas em regiões reguladoras (Leslie *et al.*, 2016). Dentre as variantes encontradas neste projeto e já bem estabelecidas na literatura temos rs861019, descrita por Peyrard-Janvid e colaboradores, sendo associada com formas sindrômicas de fissuras como Síndrome de Van der Woude (VDW) e Síndrome de Pterígio Poplíteo (SPP) (PEYRARD-JANVID *et al.*, 2005). Salahshourifar *et al* 2011 em seu estudo de sequenciamento do gene *IRF6* e o possível aumento de probabilidade de desenvolvimento FLP/NS na população da Malásia, demonstraram uma forte transmissão de múltiplos haplotipos para pacientes com FLPS/NS com ou sem fenda palatina. Haplotipos do alelo de 243 pb de D1S2136 e alelos comuns na rs861019 e rs2235371 foram transmitidos em excesso aos pacientes (Salahshourifar *et al.*, 2011). Pegelouw *et al* 2008 em seu trabalho comparativo do fenótipo de FLP/NS na população Suécia em 17 famílias, concluiu que o alelo A do SNP rs861019 no exon 2 e o alelo G de SNP rs7552506 no intron 3 mostraram associação com fissura labial e palato (razão de

possibilidades de 3.1 e 5.45, respectivamente (Pegelouw., *et al* 2008). Em nosso trabalho verificamos uma diferença estatística significativa em rs861019 ($p = 0,0002$) comparando com a frequência alélica da população Africana (gnomAD 2017) mas nenhuma diferença estatística quando comparada a população Brasileira (ABraom 2017). Este achado indica que a variante rs861019 talvez não seja significativa para o possível desenvolvimento de FLP/NS na população do Paraná.

Variante rs2235375

A variante rs2235375, definida em nosso trabalho como estatisticamente significativa comparada com a população Latina ($<0,0001$) mas sem diferença estatisticamente significativa quando comparada com a população Brasileira, já foi associada com possível potencial patogênico ao desenvolvimento de FLP/NS na população do Sul da Índia onde foram genotipados 173 indivíduos e 176 controles, sendo que neste estudo Indiano houveram diferenças significativas nas frequências dos alelos de rs2235375 entre controles e casos com lábio fissurado não sindrômico com ou sem fissura de palato. A variante no gene *IRF6* rs2235375 foi associada ao aumento do risco de FLP/NS com ou sem palato em modelos co-dominantes, dominantes (OR: 1,19; 95% IC 1,03-2,51; $p = 0,034$) e alélicos (OR: 1,40; 95 % CI 1,04-1,90, $p = 0,028$) (Gurramkonda, *et al.*, 2017).

Variantes rs2013162 e rs2235371

As variantes rs2013162 e rs2235371 detectadas neste trabalho, já foram descritas por Xu e colaboradores em seu estudo no Nordeste da China em pacientes e parentes com FLP/NS. Sua coorte foi constituída em 104 probandos, 178 parentes e 300 controles. Os resultados indicaram que houve diferenças significativas nas distribuições genéticas e alélicas entre pacientes e controles em rs2235371 e rs2013162 no gene *IRF6*. A análise caso-pai revelou excesso de transmissão do alelo C em rs2235371 e o alelo A em rs2013162. Este estudo demonstrou que as duas variantes rs2235371 e rs2013162 estão fortemente associados a FLP/NS na população do Nordeste Chinesa (Xu, *et al*, 2016). Em nosso estudo, encontramos as frequências estatisticamente significantes associadas a FLP/NS, quando

comparadas a populações Latina e Africana na variante rs2013162 ($p < 0,0001$ / $p = 0,0003$ e rs2235371 ($p = 0,0002$ / $p < 0,0001$ respectivamente) mas não na população brasileira, não diferindo estatisticamente daquela encontrada nos trabalhos supracitados. Park e colaboradores testaram 13 polimorfismos quanto à associação com FLP/NS em 77 trios Europeu-Americanos, 146 taiwaneses, 34 cingapurianos e 40 coreanos usando tanto o teste de desequilíbrio de transmissão como os modelos de regressão logística condicional.

Foram observadas evidências de ligação e associação entre as quatro populações e dois haplotipos específicos [GC composto por rs2235373-rs2235371 (p. V274I) e AAG de rs599021-rs2235373- rs595918] mostraram a sobre transmissão mais significativa entre os casos taiwaneses ($p = 9 \times 10^{-6}$) e $p = 5 \times 10^{-6}$, respectivamente). O diplótipo AGC / CGC composto por rs599021-rs2235373-rs2013162 mostrou um aumento de quase 7 vezes no risco entre a amostra taiwanesa ($p < 10^{-3}$). Estes resultados confirmaram a contribuição deste gene na susceptibilidade das FLP/NS em diferentes populações (Park *et al.*, 2007). Nosso trabalho entra em concordância ao estudo supracitado em relação a variante rs2235373, onde a mesma apresentou $p < 0,0001$ quando comparada as populações Latina e Africana, respectivamente, já para a população brasileira, esta variante não apresentou significância estatística para a predisposição a FLP/NS.

Variantes inéditas

Além da presença das variantes supracitadas já descritas na literatura para casos de FLP/S e FLP/NS para as quais não identificamos frequências alélicas diferentes dos controles de AbraOM, também nos deparamos com duas variantes que classificamos como inéditas por somente terem sido encontradas em programas *in silico* (*Alamut e Mutation Taster*) e não possuírem informações na literatura genética atual. A variante g.17743T>C foi observada com frequência ($p < 0,0001$) e de acordo com as ferramentas *in silico Alamut e Mutation taster*, esta variante pode alterar o sítio acceptor de *splice* e talvez causar alguma modificação na proteína. A variante g.4646_4647insCCTAA ($p < 0,0001$), pode mudar a região acceptora no íntron 2-. C.-3-51 e pode alterar a região promotora, gerando a formação de um novo sítio de *splice*. Sendo assim, ambas variantes foram previstas, *in silico*, como possivelmente patogênicas e ainda não descritas em bancos de dados brasileiros ou internacionais. O mecanismo pelo

qual ocorre o *splicing* foi estudado em vários sistemas biológicos, como bactérias, camundongos e humanos, e atualmente já é bem caracterizado. Os *introns* são removidos das transcrições primárias por clivagem em sequências conservadas chamadas sítios de ligação. Estes sítios são encontrados nas extremidades 5' e 3' dos *introns*. Mais comumente, a sequência de RNA que é removida começa com o dinucleótido GU na sua extremidade 5' e termina com AG na sua extremidade 3'. Essas sequências de consenso são conhecidas por serem críticas, pois a mudança em um dos nucleotídeos conservados resulta em inibição de *splicing*. Outra sequência importante ocorre no que é chamado de ponto de ramificação, localizado em qualquer lugar de 18 a 40 nucleotídeos na extremidade 3' de um *intron*. O ponto de ramificação sempre contém uma adenina, mas de outra forma é conservado vagamente (Clancy, 2008)

As demais variantes encontradas neste estudo no gene *IRF6* foram citadas somente em testes clínicos de casos suspeitos de Síndrome de Van der Woude e Síndrome de Pterígio Poplíteo, sendo todas classificadas como benignas.

Cabem aqui considerações específicas quando comparamos os nossos achados em pacientes com fissuras, com a população normal brasileira de indivíduos com variantes exômicas de 609 idosos de uma amostra censo da cidade de São Paulo por Naslavsky, Yamamoto *et al*, 2018. Vale ressaltar que nosso número amostral foi relativamente pequeno comparado com os demais estudos supracitados e mesmo assim encontramos duas variantes inéditas, fato que enriquece a importância da análise em pacientes oriundos de famílias multiplex. Também é importante destacar que das 25 variantes encontradas neste trabalho, somente 9 foram descritas no banco de dados AbraOm, o que talvez possa ser explicado por nosso trabalho ter sido focado em pacientes oriundos de famílias multiplex.

7. Conclusão

O presente estudo reforçou a importância da presença de variantes no gene *IRF6* em pacientes com FLP/NS e identificou variantes ainda não descritas no banco de dados genéticos brasileiro AbraOM. Além disto, relatamos a presença de duas variantes inéditas com potencial patogênico ainda não descritas na literatura atual, em pacientes oriundos de famílias multiplex com Fissura Labiopalatal não Síndrômica do estado do Paraná, ajudando a consolidar e ampliar os dados genéticos e populacionais relacionados a este fenótipo. Futuros estudos com número amostral maior e analisando a segregação destas variantes em indivíduos afetados e não-afetados de famílias multiplex, poderão trazer mais informações sobre a contribuição delas na etiologia das FLP/NS.

8. REFERÊNCIAS

- BEATY, T.H., *et al.* A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near *MAFB* and *ABCA4*. **Nat Genet.** v. 42, n. 6, p. 525-9, 2010;
- BEATY, T.H., *et al.* Confirming genes influencing risk to cleft lip with/without cleft palate in a case-parent trio study. **Hum. Genet.**, v. 132, p. 771–781, 2013;
- 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 Expr.** v 5, p 629-638, 2005;
- BIRBAUM, S., *et al.* Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. **Nature Genetics.** 2009 ;
- BLANTON, S. H, *et al.* Variation in *IRF6* contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. **Am. J. Med. Genet.**, v 137A, p 259–262, 2005;
- BRITO, L.A., *et al.* *IRF6* is a Risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population. **American Journal of medical genetics Part A.** v 158A, p 2170-2175, 2012;
- BUREAU, A., *et al.* Inferring rare disease risk variants based on exact probabilities of sharing by multiple affected relatives. **Bioinformatics.** v. 30, p 2189–2196, 2014;
- BUREAU, A., *et al.* Whole Exome Sequencing of Distant Relatives in Multiplex Families Implicates Rare Variants in Candidate Genes for Oral Clefts. **Genetics Society of America,** 2014;
- CAMPBELL, A., COSTELLO, B.J., RUIZ, R.L. Cleft lip and palate surgery: an update of clinical outcomes for primary repair. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am.** v 22, p 43-58, 2010;
- CIRULLI, E.T & GOLDSTEIN, D.B. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. **Nat. Rev. Genet.**, v. 11, p. 415–425, 2010;
- CARLSON, J.C., *et al.* Identification of 16q21 as a modifier of nonsyndromic orofacial cleft phenotypes. **Genet Epidemiol.** v.41, p.887–897, 2017;
- DE CASTRO, M.L., FREITAS, J.A., GRIGOLLI, A.A. Prevalence of oral clefts from 1975 to 1994, Brazil. **Rev Saúde Pública.** V 35(6), p 571-5, 2001;
- DE SOUZA, L.T., *et al.* Study of *IRF6* and 8q24 region in non-syndromic oral clefts in the Brazilian population. **Oral Diseases.**v 22, p 241-245, 2015;

- DIXON, M.J., MARAZITA, M.L., BEATY, T.H., MURRAY, J.C., Cleft lip and palate synthesizing genetic and environmental influences. **Nat. Rev. Genet.** v 12(3), p 167–178, 2011;
- GIBSON, G., Rare and common variants: twenty arguments. **Nat. Rev. Genet.**, v. 13, p. 135-145, 2012;
- FAKHOURI, W. D., *et al.* Intercellular Genetic Interaction Between *IRF6* and *TWIST1* during Craniofacial Development, *Scientific Reports*, v 7, p 2045-2322, 2017;
- GURRAMKONDA, V.B., SYED, A.H., MURTHY, J., LAKKAKULA, B.V., *IRF6* rs2235375 single nucleotide polymorphism is associated with isolated non-syndromic cleft palate but not with cleft lip with or without palate in south Indian population. **Braz J Otorhinolaryngol.** 2017
- HIRANO, A., NIIKAWA, N., YOSHIURA, K., Two missense mutations of the *IRF6* gene in two Japanese families with popliteal pterygium syndrome. **Am. J. Med. Genet.** v 152A, p 2262-2267, 2010;
- JUGESSUR, A., FARLIE, P.G., KILPATRICK, N., The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. **Oral Diseases.** v 15, p 437-453, 2009;
- KAYANO, S., *et al.* 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;
- KONDO, S., *et al.* Mutations in *IRF6* cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. **Nature Genet.** v 32, p 285-289, 2002;
- KOUSA, Y. A., *et al.* *IRF6* expression in basal epithelium partially rescues *IRF6* knockout mice. **Dev. Dyn.** v. 246, p 670–681, 2017;
- LESLIE, E.J. *et al.* A Multi-Ethnic Genome-Wide Association Study Identifies Novel Loci for Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate on 2p24.2, 17q23 and 19q13. **Human Molecular Genetics.** V 25.13, p 2862–2872, 2017;
- LESLIE, E.J., MARAZITA, M.L., Genetics of Cleft Lip and Cleft Palate. **Am. J. Med. Genet. Semin. Med. Genet.** v 163(4), p 246–258, 2013;
- LESLIE, E.J., KOBOLDT, D.C, KANG, C.J, *et al.* *IRF6* mutation screening in nonsyndromic orofacial clefting: analysis of 1521 families. **Clinical genetics.** v 90(1), p 28-34.2016;
- LIU, Y.P., *et al.* Identification of susceptibility genes in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate using whole-exome sequencing. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v 1:20 (6), p 763-770, 2015;

- LUDWIG, K.U., *et al.* Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. **Nat. Genet.**, v. 44, p. 968–971, 2012;
- MANGOLD, E., LUDWIG, K.U., NOETHEN M., Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. **Trends Mol. Med.**, v. 17, p. 1–9, 2011.
- MARAZITA, M.L., *et al.* Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. **Am J Hum Genet.** v 75, p 161–73, 2004;
- MARAZITA, M.L., The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.** v. 13, p. 263–283, 2012;
- MASOTTI, C., *et al.* *MRPL53*, a New Candidate Gene for Orofacial Clefting, Identified Using an eQTL. **Approach Journal of Dental Research.** v. 97, p. 33, 2017;
- MATSUZAWA, N., Two missense mutations of the *IRF6* gene in two Japanese families with popliteal pterygium syndrome. **Am. J. Med. Genet.** 152A: 2262-2267, 2010;
- MOSTOWSKA, A., *et al.* Common variants in *DLG1* locus are associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. **Clin Genet.** 2017;
- MOSSEY, P.A., *et al.* Cleft lip and palate. **Lancet.** v 374(9703), p 1773-85, 2009;
- MURRAY, J.C, YAMADA, A., MATSUBARA, Y., 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;
- PARADA-SANCHEZ, M.T., *et al.* Disrupted *IRF6*-NME1/2 Complexes as a Cause of Cleft Lip/Palate. *Journal of Dental Research.* v. 96, p 0022-0345, 2017;
- PARANAÍBA, L., *et al.* Lack of association between *IRF6* polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. **Oral Diseases**, v. 16, p193–197, 2010;
- PARK, J.I., *et al.* Association between *IRF6* and Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in Four Populations. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics.** v. 9.4, p 219–227, 2007.
- PEGELow, M., *et al.* Familial non-syndromic cleft lip and palate—analysis of the *IRF6* gene and clinical phenotypes. **European Journal of Orthodontics.** v. 30, p 169–175, 2008;
- RAFIGHDOOST, H., *et al.* Association of Single Nucleotide Polymorphisms in *AXIN2*, *BMP4*, and *IRF6* with Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in a Sample of the Southeast Iranian Population. **Journal of Applied Oral Science**, v. 25.6, p.650–656, 2018;

- REGO, B. A., *et al.* Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Brazilian population with high African ancestry. **Am J Med Genet**, vol167A, p 2344–2349, 2015;
- RODRIGUES, K., SENA, M.F., RONCALLI, A.G., FERREIRA M.A. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. **Braz Oral Res.** v 23(1), p 38-42, 2009;
- SALAHSHOURIFAR, L., *et al.* Contribution of variants in and near the *IRF6* gene to the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Malay population. **Am. J. Med. Genet.** v. 155, p 2302–2307, 2011;
- STROM, C.M, *et al.* Development and Validation of a Next-Generation Sequencing Assay for BRCA1 and BRCA2 Variants for the Clinical Laboratory. **Toland AE, ed. PLoS ONE.** v 10(8), 2015;
- TRAN, D.L., *et al.*, Association of *MEOX2* polymorphism with nonsyndromic cleft palate only in a Vietnamese population. **Congenit Anom.** 2017;
- VIEIRA, A.R., *et al.* PVR/CD155 Ala67Thr Mutation and Cleft Lip/Palate. **Journal of Craniofacial Surgery.** 2018;
- WANG, M., PAN, Y., ZHANG, Z., WANG, L. Three polymorphisms in *IRF6* and 8q24 are associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence from 20 studies. **Am J Med Genet.** v 158A, p 3080-3086, 2012;
- WANG, X., *et al.*, Association between a single-nucleotide polymorphism in the *GREM1* gene and non-syndromic orofacial cleft in the Chinese population. **J Oral Pathol Med**, p 1-5, 2017;
- WIJSMAN, E.M. The role of large pedigrees in an era of high-throughput sequencing. **Hum. Genet.**, v.131, p.1555-1563, 2012.
- XU, W., *et al.* Genetics and Molecular Research, Association of single-nucleotide polymorphisms, rs2235371 and rs2013162, in the *IRF6* gene with non-syndromic cleft palate in northeast China, **Dev. Dyn.** v. 15, 2017;
- 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. 351, p. 769-80, 2004.
- AbraOM. Disponível em: <http://abraom.ib.usp.br/>. Acesso, 2018;
- Alamut. Disponível em: <http://www.interactive-biosoftware.com/>. Acesso, 2018;
- Align GVGd. Disponível em: <http://agvgd.iarc.fr/>. Acesso, 2018;
- Caif. Disponível em: <http://www.caif.saude.pr.gov.br/>. Acesso 2017;

Clinvar. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Acesso, 2018;

Eclamc. Disponível em: <http://www.eclamc.org/>. Acesso, 2016;

Genetics Home Reference. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/>. Acesso, 2016;

GeneSplicer. Disponível em: http://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml. Acesso, 2018;

GnomAD. Disponível em: <http://gnomad.broadinstitute.org/>. Acesso, 2017;

Graphpad. Disponível em: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/>). Acesso, 2018;

HGMD. Disponível em: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Acesso, 2018;

IGV. Disponível em: <http://software.broadinstitute.org/software/igv/>. Acesso, 2018;

KD4v. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3394327/>. Acesso, 2018;

MaxEntScan. Disponível em: <http://genes.mit.edu/burgelab/maxent.com>. Acesso, 2018;

Mutation taster. Disponível em: <http://www.mutationtaster.org/>). Acesso, 2018;

NNSPLICE. Disponível em: <https://omictools.com/nnsplICE-tool>). Acesso, 2018;

Omim. Disponível em: <https://www.omim.org/>. Acesso, 2016;

PolyPhen-2. Disponível em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>. Acesso, 2018;

SIFT. Disponível em: <http://sift.jcvi.org/>. Acesso, 2018;

SpliceSiteFinder-like. Disponível em: <http://www.umd.be/HSF/>. Acesso, 2018;

Varsome. Disponível em: <https://varsome.com/>. Acesso, 2018;

Zymo USA. Disponível em: <http://www.zymoresearch.com/>. Acesso, 2016;

1000G. Disponível em: <http://www.internationalgenome.org/>. Acesso, 2018;

Anexo A

Tabela suplementar 1. Variantes encontradas e dados epidemiológicos dos pacientes

Variantes	Paciente	Sexo	Het/Hom	Residência	Parentes Afetados
g.16268_16269insTGCTG	B1	MASCULINO	het	PR-São José dos Pinhais	IRMÃO PATERNO E MATERNO, TIO E PRIMO PATERNO
g.16269_16270insCCTACTTTT			het		
g.209802041A>G			het		
g.209802041A>G	B2	MASCULINO	het	PR- Rio Branco do Sul	MÃE, TIO, TIA, PRIMO 2º GRAU
g.3972G>T			het		
g.16268_16269insTGCTG	B3	MASCULINO	het	PR- Curitiba	PRIMO MATERNO E PAI
g.16269_16270insCCTACTTTT			het		
g.209802041A>G			het		
g.16268_16269insTGCTG	B4	MASCULINO	het	PR- Curitiba	2 TIOS MATERNOS E AVÔ PATERNO
g.16269_16270insCCTACTTTT			het		
g.10617_10618insGGACTGCTAGCC			het		
g.209802041A>G			het		
g.4001_4001delA			het		
g.3999C>A			het		
g.3997C>A			het		
g.3996T>G			het		
g.3972G>T			het		
.	B5	MASCULINO	.	PR- Curitiba	PRIMA MATERNA E TIO PATERNO
g.209792242G>A	B6	FEMININO	hom	PR- Pirai do Sul	IRMÃO, PRIMA, TIA MATERNA E PARENTE DA AVÔ MATERNA
g.209795339C>A			hom		
g.209796557G>C			hom		
g.3974_3975insCCTTC			het		
g.3974G>T			het		
g.3972G>T	B7	FEMININO	het	PR- Curitiba	2 FILHOS DA BISAVÓ
g.209792242G>A			het		
g.209795339C>A			het		

g.10617_10618insGGACTGCTAGCC			het		
g.209796557G>C			het		
g.4646_4647insCCTAA			hom		
g.3972G>T			hom		
g.209806173T>A			het		
g.209802041A>G	B8	MASCULINO	het	PR- Pinhais	PRIMA MATERNA E UM PARENTE PATERNO
g.278T>A			het		
g.209792242G>A			het		
g.209795339C>A			het		
g.10617_10618insGGACTGCTAGCC	B9	MASCULINO	het	PR- Santa Galo	PRIMO PATERNO E SOBRINHO MATERNO
g.209796557G>C			het		
g.209802041A>G			het		
g.209806173T>A			het		
g.209790458G>A			het		
g.209790735C>T			het		
g.209792242G>A	B10	FEMININO	het	PR- Tupãssi	BISAVÔ MATERNA E TIOS GÊMEOS MATERNOS
g.209795339C>A			het		
g.209802047T>C			het		
g.209790458G>A			het		
g.209792242G>A			hom		
g.209795339C>A	B11	MASCULINO	hom	PR- Curitiba	MÃE, IRMÃO E AVÔS MATERNO
g.209796557G>C			hom		
g.209806173T>A			het		
g.209790458G>A			het		
g.209792242G>A			het		
g.209795339C>A	B12	MASCULINO	het	PR- Colombo	IRMÃO E PRIMOS POR PATERNOS E MATERNOS
g.209796557G>C			het		
g.209802041A>G			het		
g.209802041A>G	B13	FEMININO	het	PR- Prudentópolis	PRIMA 2ª E AVÔ
g.209790458G>A			het		
g.209792242G>A			het		
g.209795339C>A	B14	MASCULINO	het	PR- Ponta Grossa	PRIMA MATERNA E BISAVÔ PATERNO
g.209796557G>C			het		

g.209802041A>G			het		
g.209795339C>A	B15	MASCULINO	hom	PR- Curitiba	PRIMO MATERNO 2º E 3º GRAU
g.209802041A>G	B16	MASCULINO	het	PR- Curitiba	PRIMO MATERNO E SOBRINHO PATERNO E MATERNO
g.209790458G>A			het		
g.209792242G>A	B17	FEMININO	het	PR- Bandeirantes	TIO, PAI, AVÔ E BISAVO PATERNO
g.209795339C>A			het		
g.209796557G>C			het		
g.209802041A>G	B18	FEMININO	hom	PR- Santo Antonio Sudoeste	PRIMO, TIO E AVÔ MATERNO
g.16268_16269insTGCTG			het		
g.16269_16270insCCTACTTTT	B19	FEMININO	het	PR- Curitiba	2 PRIMOS MATERNOS E 1 PRIMO PATERNO
g.209802041A>G			het		
g.209802041A>G	B20	FEMININO	hom	PR- Pirai do Sul	PRIMO MATERNO E SOBRINHA PATERNA
g.209792242G>A			het		
g.209795339C>A			het		
g.209796557G>C	B21	MASCULINO	het	PR- Mandaguaçu	AVÔ E TIO MATERNO
g.209802041A>G			het		
g.209806173T>A			het		
g.209792242G>A			het		
g.209795339C>A			het		
g.209796557G>C	B22	FEMININO	het	PR- São José dos Pinhais	AVÔ, PAI, TIOS PATERNOS
g.209802041A>G			het		
g.209806173T>A			het		
g.17743T>C			het		
g.209792242G>A			het		
g.209795339C>A			het		
g.209796557G>C	B23	MASCULINO	het	PR- Paranaguá	TIA, TIO E PRIMO MATERNO
g.209802041A>G			het		
g.209802064dup			het		
g.209806173T>A			het		
g.209795339C>A			het		
g.209802041A>G	B24	FEMININO	het	PR- Rio Azul	PRIMO PATERNO
g.209802047T>C			het		
g.209802041A>G	B25	MASCULINO	het	PR -São Carlos	BISAVÓS E SOBRINHO

g.16268_16269insTGCTG			het		
g.16269_16270insCCTACTTTT	B26	MASCULINO	het	PR- Pato Branco	PRIMA E TIO
g.209802041A>G			hom		
g.209802041A>G	B27	FEMININO	het	PR- Ponta Grossa	IRMÃ, SOBRINHO E PRIMO
g.209792242G>A			het		
g.209795339C>A			het		
g.209796557G>C	B28	MASCULINO	het	PR- Guarapuava	TIO E PRIMO DO PATERNO
g.209802041A>G			het		
g.209806173T>A			het		
g.209802041A>G	B29	FEMININO	hom	PR- Fazenda Rio Grande	2 PRIMOS E TIA MATERNA
g.209806173T>A			het		
g.16266A>C			het		
g.16265T>A			het		
g.209790458G>A			het		
g.209792242G>A			het		
g.209795339C>A			het		
g.209795408C>A	B30	MASCULINO	het	PR- Curitiba	PRIMO E BISAVÓ
g.209796557G>C			het		
g.209802041A>G			het		
g.209802064dup			het		
g.209806173T>A			het		
g.209790458G>A			het		
g.209792242G>A			het		
g.209795339C>A			het		
g.209795408C>A	B31	FEMININO	het	PR- Pinhão	TIOS MATERNOS E PATERNOS
g.209796557G>C			het		
g.209802041A>G			het		
g.209802064dup			het		
g.209792242G>A			hom		
g.209795339C>A			hom		
g.209796557G>C	B32	MASCULINO	hom	Pr-Curitiba	TIOS PATERNOS
g.209806173T>A			hom		
g.209790458G>A	B33	FEMININO	het	PR- Ponta Grossa	BISAVÔ E PRIMO PATERNO

g.209792242G>A	het
g.209795339C>A	het
g.209796557G>C	het
041A>G	het

Anexo B. Termos de consentimentos livres e esclarecidos

GRUPO DE PACIENTES MENORES DE 16 ANOS.

O menor _____, RG n° _____, filho de _____, nascido na cidade de _____ em ____/____/____, residente atualmente na cidade de _____ Estado _____, Neste ato representado por Nome _____, RG n° _____, nascido na cidade de _____ em ____/____/____, residente atualmente na cidade de _____ Estado _____, cujo parentesco é de _____, está sendo convidado a participar do estudo denominado **“FISSURAS LÁBIO-PALATAIS: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, AMBIENTAL, GENÉTICO-CLÍNICO E MOLECULAR”**, cujo objetivo é obter dados sobre as causas desta doença, e consequentemente propor estratégias de saúde pública para melhorar o atendimento e a qualidade de vida das pessoas com fissuras labiopalatais e seus familiares. As informações existentes neste documento são para que você entenda perfeitamente os objetivos da pesquisa, e saiba que a participação dele é espontânea. Se durante a leitura deste documento houver alguma dúvida, você deverá fazer perguntas aos pesquisadores envolvidos (Salmo Raskin e Liya Regina Mikami) para que possa entender perfeitamente do que se trata. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar que seu filho(a) ou representado legal participe do estudo, assine ao final deste documento e rubrique todas as folhas do mesmo, que está em duas vias, sendo uma via sua e a outra do pesquisador responsável que também assinará e rubricará todas as folhas deste documento.

Caso durante a pesquisa o participante da pesquisa vir a completar 18 anos de idade, um novo termo de consentimento livre e esclarecido será apresentado para seu consentimento, aprovação e assinatura.

Para a realização deste estudo, o participante fará uma consulta médica, que inclui exame físico detalhado e uma entrevista com médico geneticista, aonde, caso aceite, responderá a um questionário semi-estruturado elaborado pelos pesquisadores com a finalidade de coletar dados epidemiológicos, história familiar e de exposição ambiental. Essa consulta médica e entrevista com aplicação de questionário serão realizadas dentro da consulta de rotina com o médico do CAIF e levará a um acréscimo de cerca de 20 minutos no tempo da consulta padrão.

Para as análises genéticas serão colhidos 20 ml de uma amostra de seu sangue periférico ou um swab (cotonete) de amostra de saliva, que serão propriamente identificados para controle e anonimizados e então enviados ao laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR) para a extração de DNA dos linfócitos presentes no sangue. O material genético ficará armazenado na PUC e Universidade Johns Hopkins. Uma alíquota de cerca de 50ul de DNA será então enviada a Universidade Johns Hopkins nos EUA para as análises genéticas: análises de rearranjos cromossômicos, sequenciamento do exoma e sequenciamento do genoma que irão pesquisar em seu material genético se existe alguma falha que possa ter levado ao aparecimento da fissura. Se desejar saber mais como os exames serão realizados, o pesquisador responsável lhe dará as informações em detalhes. Caso necessite, o contato com a PUC poderá ser feito através do telefone (41) 33066838 (Salmo Raskin) e com a Universidade Johns Hopkins pelo telefone (001) 410 9556960 (Terri Beaty) ou (001) 410 9554260 (David Valle).

O material genético será usado para futuras análises e de inúmeras formas, incluindo o estudo de seus cromossomos e de vários genes já implicados na causa de fissura orais entre eles FOXE1, GLI2, MSX2, SKI, SATB2 e SPRY2, que são alguns dos genes que já estão relacionados com a doença na data de hoje. Com o avanço do conhecimento sobre a causa das fissuras labiopalatais, outras alterações genéticas certamente serão identificadas por outros grupos de pesquisa. O restante do material genético que não for utilizado em uma determinada etapa deste estudo será armazenado para futuras análises e pesquisas vinculadas a esse trabalho por um período de 5 anos no Brasil e nos EUA e então seguir um dos três destinos: permanecer armazenado, ser transferido formalmente para outro biorrepositório ou biobanco,

mediante aprovação do CEP e das instituições envolvidas ou descartado. Para a utilização de seu material genético que será armazenado, em um outro estudo, você será previamente comunicado para obtenção da autorização. Esses novos estudos deverão ter a aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa. Na impossibilidade de sua autorização será solicitada ao sistema CEP/CONEP anuência para a realização da pesquisa.

A punção venosa que será realizada para obter uma amostra do sangue do participante da pesquisa não oferece risco a sua saúde e raramente no local desta punção poderá surgir um hematoma ou dor leve, sem maiores danos. Caso isso ocorra serão realizadas técnicas de calor local e aplicação tópica específica. Essa coleta será feita apenas para fins deste estudo e em nada influenciará o seu tratamento; não vai curá-lo(á); não vai causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue) e principalmente não virá interferir no atendimento ou tratamento médico que ele(a) está recebendo ou virá a receber. O risco de vazamento dos seus dados será minimizado através do comprometimento dos pesquisadores em manter confidencialidade e sigilo dos mesmos na pesquisa estando os mesmos na forma de código onde somente o pesquisador principal terá acesso a sua identidade. Existe um risco, ainda que remoto, que vocês se sintam constrangidos durante a aplicação de questionário na entrevista, caso isso ocorra, vocês podem manifestar o desejo de não realizarem a entrevista e questionário sem qualquer prejuízo no seu acompanhamento e tratamento no CAIF.

Como este é um trabalho que visa ajudar no engrandecimento da literatura científica sem fins lucrativos, os pesquisadores não estarão recebendo nada pelo desenvolvimento desse trabalho. Além disso, como é uma pesquisa sem fins lucrativos você estará isento de custos e, caso haja a necessidade de retorno para uma nova coleta de amostras, complementação de informações, consultas e exames decorrentes desse estudo você será ressarcido dos gastos referentes ao transporte e alimentação seus e do participante da pesquisa, contanto que esse retorno não represente uma consulta rotineira de seu filho(a)/dependente legal de atendimento do CAIF.

Sendo assim, participação dele(a) nesse estudo torna-se voluntária e vocês terão toda liberdade para desistirem da pesquisa a qualquer momento, sem que isso venha a prejudica-lo.

Quanto aos dados que serão obtidos nesse estudo, podemos garantir que são totalmente confidenciais e jamais serão divulgados com o nome, para tanto, será usado na forma codificada. Caso deseje, você poderá ser informado sobre os resultados das análises genéticas realizadas, assim como sobre quaisquer informações obtidas a partir dessas análises.

Informamos que todos os dados que possam identificar o participante da pesquisa ou seus familiares e imagens obtidas no experimento serão anonimizados, preservando suas identidades e em seus rostos será utilizada uma tarja garantindo suas privacidades e confidencialidades.

Os pesquisadores estão cientes de que os dados genéticos humanos não devem ser armazenados por pessoa física, requerendo a participação de instituições idôneas responsáveis, neste caso a Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Brasil) através da Escola de Medicina e a Universidade Johns Hopkins (EUA) através do Departamento de Epidemiologia da Escola de Saúde Pública na pessoa da Dra. Terri Beaty e do Instituto McKusick Nathan de Genética Médica da Escola de Medicina na pessoa do Dr. David Valle, que garantam proteção adequada. Os benefícios do uso de dados genéticos humanos coletados no âmbito da pesquisa, incluindo os estudos de genética de populações, serão compartilhados entre as instituições envolvidas citadas.

Qualquer dúvida que você tiver durante a aplicação do estudo poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis: Salmo Raskin (telefone 41 33066838) e Liya Regina Mikami (41 33614245). Se você tiver dúvidas sobre os direitos de seu filho(a) ou representado legal como um indivíduo de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná no telefone (41) 32712103, no email nep@pupr.br ou endereço Rua Imaculada Conceição 1155, Prédio Administrativo 3º andar, Bairro: Prado Velho (horário de atendimento: 2ª- 13h30 – 17h30; 3ª, 5ª e 6ª – 09h30 – 11h30) ou a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa no telefone (61) 33155878 ou no email conep@saude.gov.br que irão esclarece-lo das eventuais dúvidas originadas deste

projeto de pesquisa. O CEP/PUC é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos subordinado a CONEP que é uma instância colegiada, de natureza consultiva, deliberativa, normativa, educativa e independente, vinculada ao Conselho Nacional de Saúde.

Informamos que lhes serão asseguradas as garantias de assistência integral, gratuita e pelo tempo que for necessário, assim como acompanhamento e indenização em caso de danos decorrentes da participação no estudo e que é vedado que o material biológico armazenado seja patenteado e utilizado para fins comerciais.

Esclarecemos que os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para o participante da pesquisa ou para a sua família, mas assim que estiverem prontos estes serão disponibilizados, se for o seu desejo. Ao fazer parte deste estudo seu filho(a) ou representado legal estará contribuindo com o estudo das principais causas de fissura labiopalatal, podendo auxiliar demais indivíduos, familiares e profissionais.

Independentemente dos resultados a serem obtidos, todos os centros de referência participantes nesta pesquisa são servidos por ao menos um Médico Geneticista, que fará o devido Aconselhamento Genético para todos os pacientes que espontaneamente procurarem por este serviço, de forma gratuita.

Declaro ter recebido as devidas explicações sobre a referida pesquisa e concebo que minha desistência poderá ocorrer em qualquer momento do processo sem que haja qualquer prejuízo físico, mental ou no acompanhamento deste serviço. Declaro ainda estar ciente de que a participação é voluntária e que fui devidamente orientado quanto aos objetivos e procedimentos desta pesquisa.

Declaro que fui informado (a) sobre todos os procedimentos do estudo a serem realizados e que recebi as explicações pertinentes ao projeto e diante disso, eu _____ portador do RG _____, declaro que estou de acordo que meu filho(a) ou representado legal participe da pesquisa e autorizo a utilização dos dados obtidos referentes a ele e declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional com o pesquisador e que a sua participação é voluntária.

Curitiba, ____ de _____ de 2015.

Nome _____ do
paciente: _____

Assinatura _____ do _____ paciente

Nome _____ do _____ Pai _____ ou
Responsável _____

Assinatura _____ do _____ Pai _____ ou _____ Responsável

Nome _____ do _____ pesquisador:

Assinatura _____ do _____ pesquisador:

Responsável pela Pesquisa: Dr. Salmo Raskin
CRM PR 11162. E-mail: getika@genetika.com.br
FONE: (41) 33086838 ou (41) 99745730
Endereço: Saldanha Marinho, 1782
Curitiba– PR CEP: 80730-180

Pesquisador assistente: Prof. Liya Regina Mikami
CRBio-07 66950. E-mail liyamikami@gmail.com
FONE (41) 33614245 ou (41) 99710706.

GRUPO DE PACIENTES PARA MENORES ENTRE 16 ANOS COMPLETOS E 18 ANOS INCOMPLETOS

O menor _____, RG nº _____, filho de _____, nascido na cidade de _____ em ____/____/____, residente atualmente na cidade de _____ Estado _____, Neste ato representado por Nome _____, RG nº _____, nascido na cidade de _____ em ____/____/____, residente atualmente na cidade de _____ Estado _____, cujo parentesco é de _____, está sendo convidado a participar do estudo denominado **“FISSURAS LÁBIO-PALATAIS: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, AMBIENTAL, GENÉTICO-CLÍNICO E MOLECULAR”**, cujo objetivo é obter dados sobre as causas desta doença, e consequentemente propor estratégias de saúde pública para melhorar o atendimento e a qualidade de vida das pessoas com fissuras labiopalatais e seus familiares. As informações existentes neste documento são para que você entenda perfeitamente os objetivos da pesquisa, e saiba que a participação dele é espontânea. Se durante a leitura deste documento houver alguma dúvida, você deverá fazer perguntas aos pesquisadores envolvidos (Salmo Raskin e Liya Regina Mikami) para que possa entender perfeitamente do que se trata. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar que seu filho(a) ou representado legal participe do estudo, assine ao final deste documento e rubrique todas as folhas do mesmo, que está em duas vias, sendo uma via sua e a outra do pesquisador responsável que também assinará e rubricará todas as folhas deste documento.

Caso durante a pesquisa o participante da pesquisa vir a completar 18 anos de idade, um novo termo de consentimento livre e esclarecido será apresentado para seu consentimento, aprovação e assinatura.

Para a realização deste estudo, o participante fará uma consulta médica, que inclui exame físico detalhado e uma entrevista com médico geneticista, aonde, caso aceite, responderá a um questionário semi-estruturado elaborado pelos pesquisadores

com a finalidade de coletar dados epidemiológicos, história familiar e de exposição ambiental. Essa consulta médica e entrevista com aplicação de questionário serão realizadas dentro da consulta de rotina com o médico do CAIF e levará a um acréscimo de cerca de 20 minutos no tempo da consulta padrão.

Para as análises genéticas serão colhidos 20 ml de uma amostra de seu sangue periférico ou um swab (cotonete) de amostra de saliva, que serão propriamente identificados para controle e anonimizados e então enviados ao laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR) para a extração de DNA dos linfócitos presentes no sangue. O material genético ficará armazenado na PUC e Universidade Johns Hopkins. Uma alíquota de cerca de 50ul de DNA será então enviada a Universidade Johns Hopkins nos EUA para as análises genéticas: análises de rearranjos cromossômicos, sequenciamento do exoma e sequenciamento do genoma que irão pesquisar em seu material genético se existe alguma falha que possa ter levado ao aparecimento da fissura. Se desejar saber mais como os exames serão realizados, o pesquisador responsável lhe dará as informações em detalhes. Caso necessite, o contato com a PUC poderá ser feito através do telefone (41) 33066838 (Salmo Raskin) e com a Universidade Johns Hopkins pelo telefone (001) 410 9556960 (Terri Beaty) ou (001) 410 9554260 (David Valle).

O material genético será usado para futuras análises e de inúmeras formas, incluindo o estudo de seus cromossomos e de vários genes já implicados na causa de fissura orais entre eles FOXE1, GLI2, MSX2, SKI, SATB2 e SPRY2, que são alguns dos genes que já estão relacionados com a doença na data de hoje. Com o avanço do conhecimento sobre a causa das fissuras labiopalatais, outras alterações genéticas certamente serão identificadas por outros grupos de pesquisa. O restante do material genético que não for utilizado em uma determinada etapa deste estudo será armazenado para futuras análises e pesquisas vinculadas a esse trabalho por um período de 5 anos no Brasil e nos EUA e então seguir um dos três destinos: permanecer armazenado, ser transferido formalmente para outro biorrepositório ou biobanco, mediante aprovação do CEP e das instituições envolvidas ou descartado. Para a utilização de seu material genético que será armazenado, em um outro estudo, você será previamente comunicado para obtenção da autorização. Esses novos estudos

deverão ter a aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa. Na impossibilidade de sua autorização será solicitada ao sistema CEP/CONEP anuência para a realização da pesquisa.

A punção venosa que será realizada para obter uma amostra do sangue do participante da pesquisa não oferece risco a sua saúde e raramente no local desta punção poderá surgir um hematoma ou dor leve, sem maiores danos. Caso isso ocorra serão realizadas técnicas de calor local e aplicação tópica específica. Essa coleta será feita apenas para fins deste estudo e em nada influenciará o seu tratamento; não vai curá-lo(á); não vai causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue) e principalmente não virá interferir no atendimento ou tratamento médico que ele(a) está recebendo ou virá a receber. O risco de vazamento dos seus dados será minimizado através do comprometimento dos pesquisadores em manter confidencialidade e sigilo dos mesmos na pesquisa estando os mesmos na forma de código onde somente o pesquisador principal terá acesso a sua identidade. Existe um risco, ainda que remoto, que vocês se sintam constrangidos durante a aplicação de questionário na entrevista, caso isso ocorra, vocês podem manifestar o desejo de não realizarem a entrevista sem qualquer prejuízo no seu acompanhamento e tratamento no CAIF.

Como este é um trabalho que visa ajudar no engrandecimento da literatura científica sem fins lucrativos, os pesquisadores não estarão recebendo nada pelo desenvolvimento desse trabalho. Além disso, como é uma pesquisa sem fins lucrativos você estará isento de custos e, caso haja a necessidade de retorno para uma nova coleta de amostras, complementação de informações, consultas e exames decorrentes desse estudo você será ressarcido dos gastos referentes ao transporte e alimentação seus e do participante da pesquisa, contanto que esse retorno não represente uma consulta rotineira de atendimento do CAIF.

Sendo assim, participação dele(a) nesse estudo torna-se voluntária e vocês terão toda liberdade para desistirem da pesquisa a qualquer momento, sem que isso venha a prejudica-lo.

Quanto aos dados que serão obtidos nesse estudo, podemos garantir que são totalmente confidenciais e jamais serão divulgados com o nome, para tanto, será usado

na forma codificada. Caso deseje, você poderá ser informado sobre os resultados das análises genéticas realizadas, assim como sobre quaisquer informações obtidas a partir dessas análises.

Informamos que todos os dados que possam identificar o participante da pesquisa ou seus familiares e imagens obtidas no experimento serão anonimizados, preservando suas identidades e em seus rostos será utilizada uma tarja garantindo suas privacidades e confidencialidades.

Os pesquisadores estão cientes de que os dados genéticos humanos não devem ser armazenados por pessoa física, requerendo a participação de instituições idôneas responsáveis, neste caso a Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Brasil) através da Escola de Medicina e a Universidade Johns Hopkins (EUA) através do Departamento de Epidemiologia da Escola de Saúde Pública na pessoa da Dra. Terri Beaty e do Instituto McKusick Nathan de Genética Médica da Escola de Medicina na pessoa do Dr. David Valle, que garantam proteção adequada. Os benefícios do uso de dados genéticos humanos coletados no âmbito da pesquisa, incluindo os estudos de genética de populações, serão compartilhados entre as instituições envolvidas citadas.

Qualquer dúvida que você tiver durante a aplicação do estudo poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis: Salmo Raskin (telefone 41 33066838) e Liya Regina Mikami (41 33614245). Se você tiver dúvidas sobre os direitos de seu filho(a) ou representado legal como um indivíduo de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná no telefone (41) 32712103, no email nep@pupr.br ou endereço Rua Imaculada Conceição 1155, Prédio Administrativo 3º andar, Bairro: Prado Velho (horário de atendimento: 2ª- 13h30 – 17h30; 3ª, 5ª e 6ª – 09h30 – 11h30) ou a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa no telefone (61) 33155878 ou no email conep@saude.gov.br que irão esclarece-lo das eventuais dúvidas originadas deste projeto de pesquisa. O CEP/PUC é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos subordinado a

CONEP que é uma instância colegiada, de natureza consultiva, deliberativa, normativa, educativa e independente, vinculada ao Conselho Nacional de Saúde.

Informamos que lhes serão asseguradas as garantias de assistência integral, gratuita e pelo tempo que for necessário, assim como acompanhamento e indenização em caso de danos decorrentes da participação no estudo e que é vedado que o material biológico armazenado seja patenteado e utilizado para fins comerciais.

Esclarecemos que os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para o participante da pesquisa ou para a sua família, mas assim que estiverem prontos estes serão disponibilizados, se for o seu desejo. Ao fazer parte deste estudo seu filho(a) ou representado legal estará contribuindo com o estudo das principais causas de fissura labiopalatal, podendo auxiliar demais indivíduos, familiares e profissionais.

Independentemente dos resultados a serem obtidos, todos os centros de referência participantes nesta pesquisa são servidos por ao menos um Médico Geneticista, que fará o devido Aconselhamento Genético para todos os pacientes que espontaneamente procurarem por este serviço, de forma gratuita.

Declaro ter recebido as devidas explicações sobre a referida pesquisa e concebo que minha desistência poderá ocorrer em qualquer momento do processo sem que haja qualquer prejuízo físico, mental ou no acompanhamento deste serviço. Declaro ainda estar ciente de que a participação é voluntária e que fui devidamente orientado quanto aos objetivos e procedimentos desta pesquisa.

Declaro que fui informado (a) sobre todos os procedimentos do estudo a serem realizados e que recebi as explicações pertinentes ao projeto e diante disso, eu _____ portador do RG _____, declaro que estou de acordo que meu filho(a) ou representado legal participe da pesquisa e autorizo a utilização dos dados obtidos referentes a ele e declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional com o pesquisador e que a sua participação é voluntária.

Curitiba, ____ de _____ de 2015.

Nome _____ do
paciente: _____

Assinatura _____ do _____ paciente

Nome _____ do _____ Pai _____ ou _____ Responsável

Assinatura _____ do _____ Pai _____ ou _____ Responsável

Nome _____ do _____ pesquisador:

Assinatura _____ do _____ pesquisador:

Responsável pela Pesquisa: Dr. Salmo Raskin
CRM PR 11162. E-mail: getika@genetika.com.br
FONE: (41) 33086838 ou (41) 99745730
Endereço: Saldanha Marinho, 1782
Curitiba– PR CEP: 80730-180

Pesquisador assistente: Prof. Liya Regina Mikami
CRBio-07 66950. E-mail liyamikami@gmail.com
FONE (41) 33614245 ou (41) 99710706.

GRUPO DE PACIENTES MAIORES DE 18 ANOS

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada: Fissuras lábiopalatais: estudo epidemiológico, ambiental, genético-clínico e molecular. As informações existentes neste documento são para que você entenda perfeitamente os objetivos da pesquisa, e saiba que a sua participação é espontânea. Se durante a leitura deste documento houver alguma dúvida você deverá fazer perguntas aos pesquisadores envolvidos (Salmo Raskin e Liya Regina Mikami) para que possa entender perfeitamente do que se trata. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar assine ao final deste documento e rubrique todas as folhas do mesmo, que está em duas vias, sendo uma via sua e a outra do pesquisador responsável que também assinará e rubricará todas as folhas deste documento.

O referido estudo tem como objetivo: obter dados sobre as causas das fissuras labiopalatais e consequentemente propor estratégias de saúde pública para melhorar o atendimento e a qualidade de vida das pessoas com fissuras labiopalatais e seus familiares. Para a realização deste estudo, você participará de uma consulta médica, que inclui exame físico detalhado e uma entrevista com médico geneticista, aonde, caso aceite, responderá a um questionário semi-estruturado elaborado pelos pesquisadores com a finalidade de coletar dados epidemiológicos, história familiar e de exposição ambiental. Essa consulta médica e entrevista com aplicação de questionário serão realizadas dentro de sua consulta de rotina com o médico do CAIF e levará a um acréscimo de cerca de 20 minutos no tempo da consulta padrão.

Para as análises genéticas serão colhidos 20 ml de uma amostra de seu sangue periférico ou um swab (cotonete) de amostra de saliva, que serão propriamente identificados para controle e anonimizados e então enviados ao laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR) para a extração de DNA dos linfócitos presentes no sangue. Uma alíquota de cerca de 50ul de DNA será então enviada a Universidade Johns Hopkins nos EUA para as análises genéticas: análises de rearranjos cromossômicos, sequenciamento do exoma e sequenciamento do genoma que irão pesquisar em seu material genético se existe alguma falha que possa ter levado ao aparecimento da fissura. Seu material genético

ficará armazenado na PUC e Universidade Johns Hopkins. Se desejar saber mais como os exames serão realizados, o pesquisador responsável lhe dará as informações em detalhes. Caso necessite, o contato com a PUC poderá ser feito através do telefone (41) 33066838 (Salmo Raskin) e com a Universidade Johns Hopkins pelo telefone (001) 410 9556960 (Terri Beaty) ou (001) 410 9554260 (David Valle).

O material genético será usado para futuras análises e de inúmeras formas, incluindo o estudo de seus cromossomos e de vários genes já implicados na causa de fissura orais entre eles FOXE1, GLI2, MSX2, SKI, SATB2 e SPRY2, que são alguns dos genes que já estão relacionados com a doença na data de hoje. Com o avanço do conhecimento sobre a causa das fissuras labiopalatais, outras alterações genéticas certamente serão identificadas por outros grupos de pesquisa. O restante do material genético que não for utilizado em uma determinada etapa deste estudo será armazenado para futuras análises e pesquisas vinculadas a esse trabalho por um período de 5 anos no Brasil e nos EUA e então seguir um dos três destinos: permanecer armazenado, ser transferido formalmente para outro biorrepositório ou biobanco, mediante aprovação do CEP e das instituições envolvidas ou descartado. Para a utilização de seu material genético que será armazenado, em um outro estudo, você será previamente comunicado para obtenção da autorização. Esses novos estudos deverão ter a aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa. Na impossibilidade de sua autorização será solicitada ao sistema CEP/CONEP anuência para a realização da pesquisa.

A punção venosa que será realizada para obter uma amostra de seu sangue não oferece risco a sua saúde e raramente no local desta punção poderá surgir um hematoma ou dor leve, sem maiores danos. Caso isso ocorra serão realizadas técnicas de calor local e aplicação tópica específica. Essa coleta será feita apenas para fins deste estudo e em nada influenciará o seu tratamento; não vai te curar; não vai te causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue) e principalmente não virá interferir no atendimento ou tratamento médico que está recebendo ou virá a receber. O risco de vazamento dos seus dados será minimizado através do comprometimento dos pesquisadores em manter confidencialidade e sigilo dos mesmos na pesquisa estando

os mesmos na forma de código onde somente o pesquisador principal terá acesso a sua identidade. Existe um risco, ainda que remoto, que você se sinta constrangido durante a aplicação de questionário na entrevista, caso isso ocorra, você pode manifestar seu desejo de não realizar a entrevista e questionário sem qualquer prejuízo no seu acompanhamento e tratamento no CAIF.

Como este é um trabalho que visa ajudar no engrandecimento da literatura científica sem fins lucrativos, os pesquisadores não estarão recebendo nada pelo desenvolvimento desse trabalho. Além disso, como é uma pesquisa sem fins lucrativos você estará isento de custos e, caso haja a necessidade de seu retorno para uma nova coleta de amostras, complementação de informações, consultas e exames decorrentes desse estudo você será ressarcido dos gastos referentes ao transporte e alimentação e caso haja a necessidade de acompanhante, ele também terá suas despesas ressarcidas, contanto que esse retorno não represente uma consulta rotineira de atendimento ao CAIF.

Sendo assim, sua participação nesse estudo torna-se voluntária e você terá toda liberdade para desistir da pesquisa a qualquer momento, sem que isso venha a lhe prejudicar.

Quanto aos dados que serão obtidos nesse estudo, podemos garantir que são totalmente confidenciais e jamais serão divulgados com seu nome, para tanto, será usado na forma codificada. Caso deseje, você poderá ser informado sobre os resultados das análises genéticas realizadas, assim como sobre quaisquer informações obtidas a partir dessas análises.

Informamos que todos os dados que possam identificar você ou seus familiares e imagens obtidas no experimento serão anonimizados, preservando sua identidade e em seu rosto será utilizada uma tarja garantindo sua privacidade e confidencialidade.

Os pesquisadores estão cientes de que os dados genéticos humanos não devem ser armazenados por pessoa física, requerendo a participação de instituições idôneas responsáveis, neste caso a Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Brasil) através da Escola de Medicina e a Universidade Johns Hopkins (EUA) através do Departamento de Epidemiologia da Escola de Saúde Pública na pessoa da Dra. Terri Beaty e do Instituto McKusick Nathan de Genética Médica da Escola de Medicina na pessoa do Dr.

David Valle, que garantam proteção adequada. Os benefícios do uso de dados genéticos humanos coletados no âmbito da pesquisa, incluindo os estudos de genética de populações, serão compartilhados entre as instituições envolvidas citadas.

Qualquer dúvida que você tiver durante a aplicação do estudo poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis: Salmo Raskin (telefone 41 33066838) e Liya Regina Mikami (41 33614245). Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um indivíduo de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná no telefone (41) 32712103, no email nep@pupr.br ou endereço Rua Imaculada Conceição 1155, Prédio Administrativo 3º andar, Bairro: Prado Velho (horário de atendimento: 2ª- 13h30 – 17h30; 3ª, 5ª e 6ª – 09h30 – 11h30) ou a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa no telefone (61) 33155878 ou no email conep@saude.gov.br que irão esclarece-lo das eventuais dúvidas originadas deste projeto de pesquisa. O CEP/PUC é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos subordinado a CONEP que é uma instância colegiada, de natureza consultiva, deliberativa, normativa, educativa e independente, vinculada ao Conselho Nacional de Saúde.

Informamos que lhe serão asseguradas as garantias de assistência integral, gratuita e pelo tempo que for necessário, assim como acompanhamento e indenização em caso de danos decorrentes da participação no estudo e que é vedado que seu material biológico armazenado seja patenteado e utilizado para fins comerciais.

Esclarecemos que os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você ou para a sua família, mas assim que estiverem prontos estes serão disponibilizados, se for o seu desejo. Ao fazer parte deste estudo você estará contribuindo com o estudo das principais causas de fissura labiopalatal, podendo auxiliar demais indivíduos, familiares e profissionais.

Independente dos resultados a serem obtidos, todos os centros de referência participantes nesta pesquisa são servidos por ao menos um Médico Geneticista, que fará

o devido Aconselhamento Genético para todos os pacientes que espontaneamente procurarem por este serviço, de forma gratuita.

Declaro ter recebido as devidas explicações sobre a referida pesquisa e concebo que minha desistência poderá ocorrer em qualquer momento do processo sem que haja qualquer prejuízo físico, mental ou no acompanhamento deste serviço. Declaro ainda estar ciente de que a participação é voluntária e que fui devidamente orientado quanto aos objetivos e procedimentos desta pesquisa.

Declaro que fui informado (a) sobre todos os procedimentos do estudo a serem realizado comigo e que recebi as explicações pertinentes ao projeto e diante disso, eu _____ portador

do

RG _____, declaro que estou de acordo em participar da pesquisa e autorizo a utilização dos dados obtidos referente à minha pessoa e declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional com o pesquisador e que a minha participação é voluntária.

Assinatura: _____

Curitiba, _____ de _____ de 201__.

Responsável pela Pesquisa: Dr. Salmo Raskin

CRM PR 11162. E-mail: getika@genetika.com.br

FONE: (41) 33066838 ou (41) 99745730

Endereço: Rua Saldanha Marinho, 1782

Curitiba– PR CEP: 80730-180

Anexo C**PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: FISSURAS LÁBIOPALATAIS; ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, AMBIENTAL, GENÉTICO- CLÍNICO E MOLECULAR

Pesquisador: Salmo Raskin

Área Temática: Genética Humana: (Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Versão: 3

CAAE: 45463615.4.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health

Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.349.674

APROVADO