



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Rayane Ferreira da Silva

**EPIDEMIOLOGIA DESCRITIVA E IMPLICAÇÕES DO GENE *IRF6* EM UMA
SÉRIE DE CASOS DE FENDAS OROFACIAIS TÍPICAS**

Maceió
2022

RAYANE FERREIRA DA SILVA

**EPIDEMIOLOGIA DESCRITIVA E IMPLICAÇÕES DO GENE *IRF6* EM UMA
SÉRIE DE CASOS DE FENDAS OROFACIAIS TÍPICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Linha de Pesquisa: Epidemiologia e etiopatogenia das doenças humanas.

Orientadora: Profa. Dra. Isabella Lopes Monlleó

Coorientador: Prof. Dr. Reginaldo José Petrolí

Maceió
2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586e Silva, Rayane Ferreira da.
Epidemiologia descritiva e implicações do gene *IRF6* em uma série de casos de fendas orofaciais típicas / Rayane Ferreira da Silva. – 2022.
92 f. : il., graf., tabs. color.

Orientadora: Isabella Lopes Monlleó.

Co-orientador: Reginaldo José Petrolí.

Dissertação (mestrado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 64-68.

Anexos: f. 69-92.

1. Fenda labial. 2. Fenda palatina. 3. Síndrome de Van der Woude. 4. Gene *IRF6*. I. Título.

CDU: 616.317




Folha de Aprovação

RAYANE FERREIRA DA SILVA


EPIDEMIOLOGIA DESCRITIVA E IMPLICAÇÕES DO GENE *IRF6* EM
UMA SÉRIE DE CASOS DE FENDAS OROFACIAIS TÍPICAS

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas aprovada em 24 de outubro de 2022.


Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 ISABELLA LOPES MONLLEO
Data: 24/10/2022 13:32:35-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a ISABELLA LOPES MONLLEO - (Orientadora)

Documento assinado digitalmente
 CAROLINNE DE SALES MARQUES
Data: 27/10/2022 16:12:14-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a CAROLINNE DE SALES MARQUES – (UFAL)

Documento assinado digitalmente
 THALITA CRISTINA FIGUEIREDO CUNHA
Data: 24/10/2022 13:47:00-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a THALITA CRISTINA FIGUEIREDO CUNHA – (UFAL)

PPGCS - ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões - Av. Lourival Melo Mota, S/N - Tabuleiro dos Martins - Maceió - AL - CEP: 57072-900 - E-mail: ppgcs@icbs.ufal.br - Telefone: 82 3214 1850

À minha família e amigos,
alicerces da minha vida.
À Pomy (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, professora Isabella Monlleó, por todos os ensinamentos, paciência e por ser uma pessoa iluminada, não só na minha vida, mas de todos que a tem por perto. Por não desacreditar de mim, mesmo nos meus momentos mais difíceis. Sou grata por todos os puxões de orelha e conselhos, tudo isso me fez crescer profissionalmente e pessoalmente. Reforço, a senhora não é apenas minha orientadora, mas uma parte da minha família que levarei felizmente no meu coração.

Assim como meu coorientador, professor Reginaldo Petroli, pessoa que me acolheu de braços abertos lá em 2017, acolhimento que dura até hoje e espero que dure por muito mais tempo. Obrigada por tudo, por sua extrema paciência, calma e seus ensinamentos.

À professora Débora Michelatto, por todas as explicações e dizer “calma que vai dar certo” e por sempre não focar no problema, mas na solução.

Agradeço a todos os meus companheiros e companheiras que estiveram comigo nesta jornada no LGMH/HUPAA-UFAL. Especialmente à Pom Pom (*in memorian*) e ao meu amigo Diogo Lucas, por todo companheirismo, por tantos momentos felizes, pelas caronas, pelos nossos sequenciamentos. Obrigada por tudo!

Também sou grata a todos que continuam aquecendo o coração do LGMH. Ao professor Marshall, Virgílio, Mari, Chrys, Reinaldo. Não poderia deixar de agradecer também às minhas meninas: Gabi, Mirelle, Thays, Rayssa e Grazi.

Agradeço aos nossos colegas de pesquisa da Unicamp, prof^a Vera Lúcia, prof^o Tarsis, Matheus, Tamiris, Milena e a todos que colaboraram para esta pesquisa acontecer.

Ao PPGCS/UFAL por propiciar momentos de extremo aprendizado e possibilitar que este projeto pudesse ser realizado.

Aos meus amigos de vida: Alessandro, Alyson, Adrícia, Ana Carla, Thayná, Cleverson, Danda, Tam, Ríllary, Belarmino, Ramila, Luís Felipe, Wéllia, Sibebe, Thales, Júnior, Bia, Deize, Dani e Carla.

Agradeço à minha deusa majestosa, conhecida como minha mãe Sueli, por todo carinho, afeto, apoio e por sempre acreditar em mim. Aos meus irmãos: Mone, Telma, Peu e Binho. À minha linda sobrinha Helô. Aos meus anjos (*in memorian*): meu pai José Eulálio, aos meus avós, Catarina, João Alexandre e Hosana.

Agradeço a Deus por me guiar, proteger e por traçar meu destino.

RESUMO

Introdução: As fendas orofaciais típicas (FOT) estão entre as malformações humanas mais frequentes, com prevalência de 1:700 a 1000 nascidos vivos. Variantes no gene *IRF6* (fator regulatório de interferon 6) têm sido mundialmente implicadas tanto em casos não síndromicos (FOTNS) familiares quanto síndromicos (FOTS), entre os quais destaca-se a Síndrome de Van der Woude (SVW). **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo descrever o perfil epidemiológico e as implicações do gene *IRF6* nas FOTNS e SVW em uma série de casos oriundos do ambulatório de genética craniofacial do Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (SGC/HUPAA-UFAL). **Pacientes e métodos:** A amostra para a descrição das características sociodemográficas, clínicas e familiares consistiu em 255 pacientes com FOTNS atendidos no período 2009-2021. As variáveis de interesse foram extraídas da Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais. Os dados foram tabulados em planilha *Excel* e analisados utilizando o programa *Epi info*TM. Foram empregados testes de *Fisher* e Qui-quadrado, sendo considerados significativos os resultados com $p < 0,05$. Para a caracterização molecular, foram selecionadas 27 famílias com recorrência de FOTNS e um paciente com SVW, único da casuística com este diagnóstico. Seis das 27 famílias apresentaram transmissão genitor(a)-filho(a) e foram estudadas por sequenciamento do exoma em parceria com a Universidade Estadual de Campinas. As demais famílias e o caso de SVW foram estudados por sequenciamento de Sanger do *IRF6* no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) do SGC/HUPAA-UFAL. Neste, os experimentos compreenderam a extração de DNA a partir de sangue total periférico pelo método fenol-clorofórmio, reação em cadeia da polimerase dos *exons* e suas respectivas regiões doadoras e receptoras de *splice* do *IRF6*, purificação dos fragmentos obtidos, quantificação e reação de sequenciamento, seguida de eletroforese capilar no analisador de DNA ABI 3500. Para a análise dos resultados, foram utilizados os *softwares Chromas* para análise dos eletroferogramas e *CLC Sequence Viewer* para alinhamento com a sequência selvagem (ENST00000367021.8). As variantes identificadas foram pesquisadas em bancos de dados de acesso público. Para variantes não descritas a classificação foi realizada através de análise preditiva *in silico* utilizando os programas *PROVEAN*, *SIFT*, *PolyPhen-2*, *Mutation Taster*, *Align GVGD* e *MutPred-2*; análise de conservação de aminoácidos entre espécies (programa *Clustal Omega*); e modelagem da proteína pelos programas *Swiss-model* e *PyMol*. **Resultados:** Entre 2009-2021, 375 pacientes com fendas orofaciais foram atendidos no ambulatório de genética craniofacial, destes, 255 (71,6%) apresentavam FOTNS. Nesta amostra houve predomínio de fenda do lábio e palato (51,0%) com acometimento unilateral (74,2%) esquerdo (51,0%) sendo que o sexo biológico masculino foi o mais afetado (55,8%), dados que corroboram a literatura. Os casos familiares corresponderam a 38,7% da amostra, quase o dobro do esperado. As fendas de lábio com ou sem acometimento do palato ($p=0,14$), a consanguinidade parental ($p=0,02$) e a gemelaridade ($p=0,008$) foram significativamente mais frequentes nos casos familiares comparados aos esporádicos. A análise das seis famílias com transmissão genitor(a)-filho(a) está completa e não revelou nenhuma variante patogênica no gene *IRF6*. Das 21 famílias restantes, em 17 delas a análise não está concluída, mas até o momento também não revelou variantes patogênicas nas regiões sequenciadas. A criança com SVW teve diagnóstico clínico estabelecido com base na presença de elevações paramedianas no lábio inferior associadas à fenda labiopalatina, típicas da síndrome. Para esta paciente o sequenciamento de Sanger do *IRF6* revelou a variante nova p.Phe266Ser (c.797T>C) em heterozigose (TTT/TCT). Esta variante foi classificada como patogênica

em todos os programas de predição utilizados, a comparação entre espécies indicou que o aminoácido p.Phe266 é altamente conservado na proteína IRF6, o sequenciamento dos genitores revelou que esta alteração não foi herdada, sendo portanto classificada como alteração *de novo*. A análise de modelagem foi sugestiva de que a substituição da fenilalanina pela serina causa danos à estrutura da proteína. **Conclusões:** Os resultados evidenciaram características sociodemográficas e clínicas das FOTNS semelhantes à literatura, exceto pela alta frequência de casos familiares e consanguinidade parental. Até o momento não foi observada nenhuma variante patogênica do *IRF6* nos casos familiares de FOTNS incluindo os casos de transmissão genitor(a)-filho(a). A variante nova p.Phe266Ser, presente no único caso de SVW desta casuística, foi classificada como patogênica e *de novo*.

Palavras-chave: Fissura de lábio, Fissura de lábio e palato, Fissura de palato, Síndrome de Van der Woude, gene *IRF6*.

ABSTRACT

Background: Typical orofacial clefts (TOC) are among the most frequent human malformations, with a prevalence rate of 1:700 to 1000 live births. *IRF6* gene (Interferon Regulatory Factor 6) has been worldwide implicated in cases of familial non-syndromic TOC and in the Van der Woude syndrome (VWS). **Aim:** To describe the epidemiology and the implications of *IRF6* gene in a series of non-syndromic TOC and VWS from the *Ambulatório de Genética Craniofacial do Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (SGC-HUPAA-UFAL)*. **Patients and methods:** From 2009 to 2021, 375 patients entered the Alagoas database, 255 (71.6%) of whom, presenting non-syndromic TOC, were selected for sociodemographic, clinical, and familial profiling. Information was extracted from the Brazilian Database on Craniofacial Anomalies and tabulated using Excel. Fisher test and Qui-square were used for statistics with a p-value of 0,05 through Epi info™. The *IRF6* gene was selected for molecular analysis of 21 multiplex families and the single case of VWS of the sample. Six families presenting parent-child transmission were studied through whole exome sequencing in collaboration with the State University of Campinas. The remaining families as well as the patient diagnosed with VWS were studied through Sanger sequencing at our laboratory at SGC-HUPAA-UFAL. The in-house experiments comprised: Phenolic DNA extraction, the polymerase chain reaction of all *exons* and splice sites, purification, quantification, and sequencing reaction. Software Chromas was used for electropherogram analysis and the CLC Sequencing Viewer for sequences alignment. Identified variants were checked against free access databases. *In silico* predictive analyses using software *PROVEAN*, *SIFT*, *PolyPhen-2*, *Mutation Taster*, *Align GVDG* e *MutPred-2* were used for the classification purpose of the new variants. The amino acid conservation among mammals analysis was through *Clustal Omega*, and the protein modeling through *Swiss-model* and *PyMol* software. **Results:** Among 255 patients with non-syndromic TOC, the male biologic sex (55,8%), and the unilateral (74,2%), left-sided (51,0%) cleft lip and palate (51,0%) were predominant. These results corroborate the literature. There were 97 (38,6%) familial cases, almost twice the expected frequency. Cleft lip with/without cleft palate (p=0,14), parental consanguinity (p=0,02) and twinning (p=0,008) were significantly high in familial cases compared to sporadic. The *IRF6* complete sequencing did reveal no pathogenic variants among the six parent-child transmission families. Sanger sequencing of the remaining families is not finished, and, up to now, no pathogenic variants have been recognized. The clinical diagnosis of VWS was based on the typical association between cleft lip and palate, and paramedian lower-lip small mounds. The novel p.Phe266Ser (c.797T>C) heterozygous (TTT/TCT) variant was identified through Sanger sequencing. It has achieved pathogenic scores in all prediction software used. According to *Clustal Omega*, the amino acid phenylalanine is highly conserved, and the parental sequencing showed this is a *de novo* variant. According to the model obtained, the phenylalanine-serine exchange disrupts the *IRF6* protein. **Conclusions:** Apart from the high rate of familial cases and consanguinity, the sociodemographic and clinical profile of non-syndromic TOC corroborates the literature. Up to now, no *IRF6* pathogenic variant was found among 27 families presenting non-syndromic TOC, including the six families with parent-child transmission for which the *IRF6* sequencing is finished. The novel p.Phe266Ser variant, present in the single case of VWS in this series, was classified as pathogenic and *de novo*.

Keywords: Cleft lip, Cleft lip and palate, cleft palate; Van der Woude Syndrome; *IRF6* gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Tipos, frequências e etiologias das FOT.....	18
Figura 2- Representação dos 22 cromossomos autossomos e os <i>loci</i> identificados e associados com o desenvolvimento de FOTNS	18
Figura 3 - Prevalência de FO no Brasil..	19
Figura 4 – Gene <i>IRF6</i> : localização, constituição, codificação e estrutura proteica.	21
Figura 5 - Etapas de seleção da casuística para descrição sociodemográfica, clínica e investigação molecular dos casos atendidos no SGC/HUPAA-UFAL.	25
Figura 6 -Representação gráfica do risco estimado de variantes genéticas conforme <i>software Align GV GD</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos casos familiares da amostra.....	36
Tabela 2 - Distribuição das características sociodemográficas e clínicas entre os grupos familiar e esporádico de FOTNS na amostra.....	37
Tabela 3 - Descrição das variantes identificadas nos casos de FOTNS.	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos nove <i>exons</i> do <i>IRF6</i> .	28
Quadro 2 - Condições e reagentes para a amplificação dos <i>exons</i> .	29
Quadro 3 - Resultados do sequenciamento do gene <i>IRF6</i> nos casos de FOTNS estudados no LGMH/HUPAA-UFAL	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

'	Minutos
°C	Graus Celsius
µg	<i>Microlitro</i>
ADNPM	Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
BBAC	Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos Trifosfatos
FL	Fenda do lábio
FLP	Fenda do lábio e palato
FO	Fenda orofacial
FOA	Fenda orofacial atípica
FOT	Fenda orofacial típica
FOTNS	Fenda orofacial típica não síndrômica
FOTS	Fenda orofacial típica síndrômica
FP	Fenda do palato
GRHL3	fator de transcrição tipo <i>grainyhead 3</i>
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
H ₂ O	Água
HGMD	<i>The Human Gene Mutation Database</i>
HUPAA	Hospital Universitário Professor Alberto Antunes
IC	<i>Intervalo de confiança</i>
<i>IRF6</i>	Fator regulatório de interferon 6
<i>Ladder</i>	Marcador de peso molecular
LGMH	Laboratório de Genética Molecular Humana
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Militros
mM	Milimolar
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pb	Pares de base
PCFB	Projeto Crânio-Face Brasil
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmoles	Picomol
q	Braço longo do cromossomo
SGC	Serviço de Genética Clínica
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SPP	<i>Síndrome Pterígeo Poplíteo</i>
SVW	Síndrome de Van der Woude
TA	Temperatura de anelamento
TALE	Termo de Assentimento Livre Esclarecido
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCLE	Termo de Compromisso Livre Esclarecido
U	Unidade
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UV	<i>Ultravioleta</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.2. Classificação clínico-etiológica e epidemiologia das fendas orofaciais típicas ..	17
2.3. Implicações do gene <i>IRF6</i> em fendas orofaciais típicas.....	20
2.4. Atenção à saúde de pessoas com fendas orofaciais no SGC/HUPAA-UFAL	22
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 Aspectos éticos	25
4.2 Delineamento do estudo	25
4.3 População estudada.....	25
4.3.1. Critérios de seleção da amostra para descrição características sociodemográficas, clínicas e familiares	26
4.3.2. Critérios de seleção da amostra para análise do gene <i>IRF6</i>	26
4.4 Experimentos	26
4.4.1 Extração de DNA.....	27
4.4.3 Reação de sequenciamento e eletroforese capilar	29
4.5 Análises preditivas <i>in silico</i> de variantes novas	30
4.5.1 <i>PROVEAN</i>	30
4.5.2 <i>SIFT</i>	31
4.5.3 <i>PolyPhen-2</i>	31
4.5.4 <i>Mutation Taster</i>	31
4.5.5 <i>Align GVGD</i>	31
4.5.6 <i>MutPred2</i>	32
4.6 Análise de conservação	32
4.7 Análises estatísticas	33
5. RESULTADOS	34
5.1 Epidemiologia descritiva das FOTNS	34
5.2 Análise do gene <i>IRF6</i>	37
5.2.1 Gene <i>IRF6</i> nos casos familiares de FOTNS	37
5.3 O gene <i>IRF6</i> na Síndrome de Van der Woude	44
6. DISCUSSÃO	44
6.1. Epidemiologia descritiva dos casos de FOTNS	44
6.2. Implicação do gene <i>IRF6</i> nos casos familiares de FOTNS	46

6.3 Artigo: Descrição de uma variante patogênica nova no gene <i>IRF6</i> em um caso de Síndrome de Van der Woude.....	48
7. CONCLUSÕES	62
8. LIMITAÇÕES	63
9. REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	69
ANEXO A	69
ANEXO B.....	70
ANEXO C.....	74
ANEXO D	76

1. INTRODUÇÃO

As fendas orofaciais típicas (FOT) constituem um grupo heterogêneo no que diz respeito à etiologia, prevalência, desenvolvimento embrionário atípico e espectro fenotípico (MARTINELLI et al., 2020). Os afetados unicamente pela FOT são classificados como não sindrômicos (FOTNS). Estes apresentam alterações morfofuncionais restritas à região oral e à audição, comprometendo a fala, alimentação/nutrição, respiração e aparência facial, que podem interferir negativamente no estabelecimento de relações sociais. Já os afetados por fendas orofaciais sindrômicas (FOTS) podem apresentar alterações morfofuncionais em diferentes sistemas orgânicos (DIXON et al., 2011). A Síndrome de Van der Woude (SVW) é o exemplo mais comum de FOTS.

Devido à complexidade dos mecanismos envolvidos nas FO e na gestão e atenção às famílias, necessita-se de um grupo multidisciplinar com equipe mínima constituída de fonoaudiólogos, psicólogos, odontólogos, cirurgiões, pediatras e geneticistas (VOIGT et al., 2017).

Esta pesquisa está inserida no Grupo-CNPq *Prevenção e atenção à saúde de pessoas com defeitos congênitos e doenças raras no SUS*, na linha de fendas orofaciais, iniciada no Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (SGC/HUPAA-UFAL) em 2009.

No período de agosto/2009 a agosto/2021, 375 famílias com fendas orofaciais foram atendidas. Até o início desta pesquisa, os estudos contemplaram a caracterização clínica, o mapeamento de fatores de risco e as dificuldades de acesso ao tratamento especializado e aconselhamento genético em Alagoas.

Em 2019, a aquisição de um analisador genético pelo mencionado grupo possibilitou a realização de estudos próprios sobre a etiologia de anomalias congênitas, com a perspectiva de ampliação do conhecimento sobre a epidemiologia molecular das FOT no estado de Alagoas.

Nesse contexto, como ponto de partida, foi escolhido o gene *IRF6* (fator regulatório de interferon 6). Esse gene tem sido mundialmente implicado tanto em casos de FOTS quanto FOTNS familiares (BEZERRA et al., 2020; MACHADO et al., 2018; BASHA et al., 2020).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Embriologia, definição e epidemiologia das fendas orofaciais

O desenvolvimento embrionário da face envolve mecanismos complexos que regulam células epiteliais e mesenquimais. A perturbação de fatores que participam deste processo interfere no crescimento e adesão celular, prejudicando a fusão das estruturas frontonasais e maxilares, o que pode resultar em fenda orofacial (MARTINELLI et al., 2020).

As fendas orofaciais são as malformações congênitas mais comuns em humanos, que afetam o desenvolvimento craniofacial. São classificadas topograficamente como fenda orofacial típica (FOT) e fenda orofacial atípica (FOA) (TOLAROVÁ; CERVENKA, 1998).

As FOA são condições raras, com incidência de 1-5 em 100.000 nascimentos, que comprometem a região mediana, transversal ou oblíqua da face (TOLAROVÁ; CERVENKA, 1998). Tessier (1976) propôs uma classificação que emprega números de 0 a 14, sendo o 0 correspondente à linha mediana da face. As FO numeradas de 0 a 7 acometem tecidos moles e ossos da face, já as de número 8 a 14, afetam tecidos moles e ossos do crânio e/ou da face.

As FOT têm incidência global de 1:1000 nascidos vivos e são definidas como anomalias paramedianas da região craniofacial que afetam o desenvolvimento do lábio (FL), do palato (FP) ou ambos (FLP) (BEATY; MARAZITA; LESLIE, 2016; LESLIE et al., 2016b; MACHADO et al., 2018). Há inúmeras classificações baseadas nos aspectos morfológicos das FOT. A classificação proposta por Spina (1973) que toma como ponto de referência o forame dos incisivos é a mais conhecida e utilizada no Brasil. Segundo esta classificação, as FL ocorrem na região pré-forame, as FLP são transforame e as FP são pós-forame dos incisivos.

Nos anos mais recentes, fenótipos subclínicos das FOT têm sido descritos. Estes incluem malformações dentárias, defeitos no músculo orbicular *oris*, fendas labiais frustras, fossetas no lábio, fenda palatina submucosa, úvula bífida, insuficiência velofaringeana e anquiloglossia. O estudo desses subfenótipos auxilia na melhor compreensão dos fatores genéticos que participam na embriogênese da face, por esse motivo, cada vez menos se utiliza a classificação de Spina (1973) em estudos epidemiológicos e etiopatogênicos (DIXON et al., 2011).

Desde 2008, o Projeto Crânio-Face Brasil (PCFB) coleta dados clínicos e genéticos de pessoas com fendas orofaciais de maneira sistematizada em hospitais voluntários localizados nas regiões nordeste, sudeste e sul do Brasil. O SGC/HUPAA-UFAL participa desta iniciativa desde 2009 (MONLLEÓ et al., 2013).

No PCFB, as FOT são classificadas de acordo com a topografia, lateralidade e gravidade clínica de maneira que tanto fenótipos clássicos quanto subclínicos são uniformemente registrados (GIL-DA-SILVA-LOPES et al., 2020; MONLLEÓ et al., 2013; VOLPE-AQUINO et al., 2018).

2.2. Classificação clínico-etiológica e epidemiologia das fendas orofaciais típicas

A partir da caracterização minuciosa do fenótipo, as FOT são classificadas como FOTNS e FOTS. As FOTNS são observadas em 70% dos casos (Figura 1) e não estão associadas a nenhuma outra alteração anatômica, exceção feita a variantes anatômicas cerebrais e deficiência intelectual (DIXON et al., 2011). Embora os afetados por FOTNS tenham alterações morfofuncionais restritas à região orofacial, estas podem comprometer a fala, aparência, alimentação, respiração e audição que podem interferir negativamente no estabelecimento de relações sociais (LESLIE; MARAZITA, 2013; WANG et al., 2018).

Quanto à etiologia, as FOTNS seguem padrão de herança poligênico/multifatorial (Figura 1), resultado da interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Essa interação complexa, constitui um desafio para a elucidação dos mecanismos etiológicos envolvidos, especialmente em populações miscigenadas como a brasileira (BEATY; MARAZITA; LESLIE, 2016; MACHADO et al., 2018).

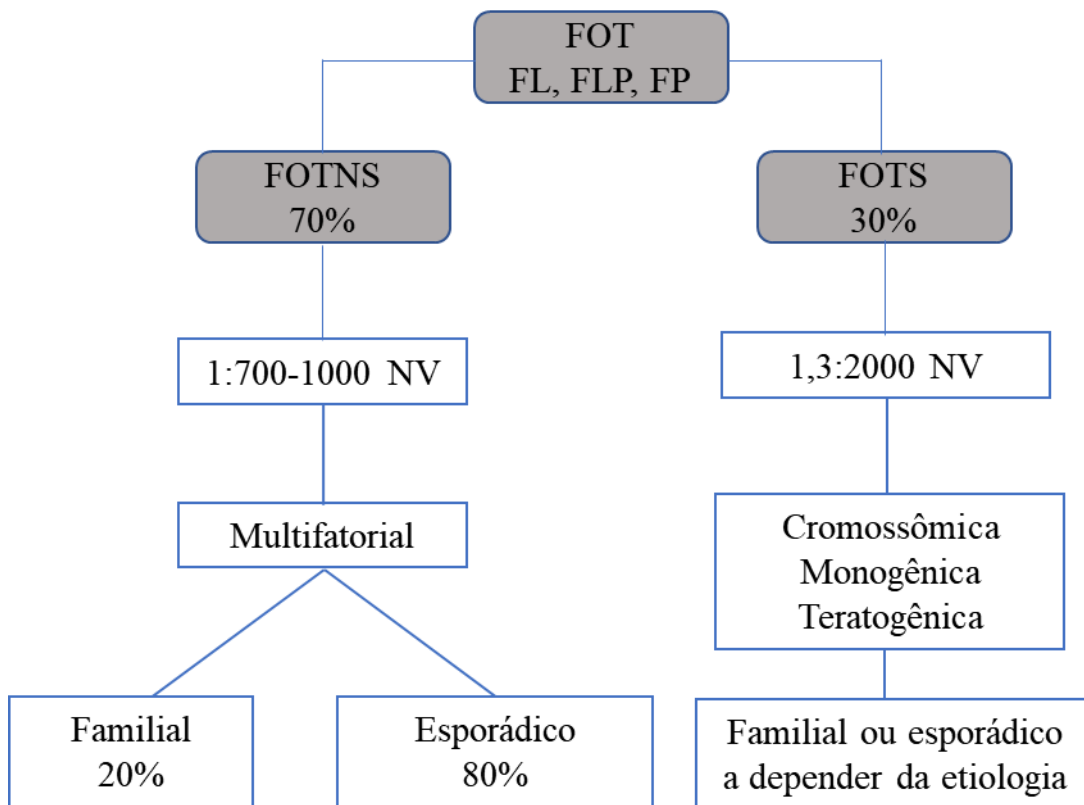


Figura 1- Tipos, frequências e etiologias das FOT. FOT= Fendas orofaciais típicas; FOTS= Fendas orofaciais típicas sindrômicas; FOTNS= Fendas orofaciais típicas não sindrômicas; FL= Fenda do lábio; FP= Fenda do palato; FLP= Fenda do lábio e palato; NV: nascidos vivos. Fonte: SALEEM et al., (2019).

Pesquisas utilizando como principal ferramenta molecular os estudos de associação genômica ampla (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Studies*) indicam que mais de 30 genes podem estar relacionados com FOTNS (SALEEM et al., 2019) (Figura 2).

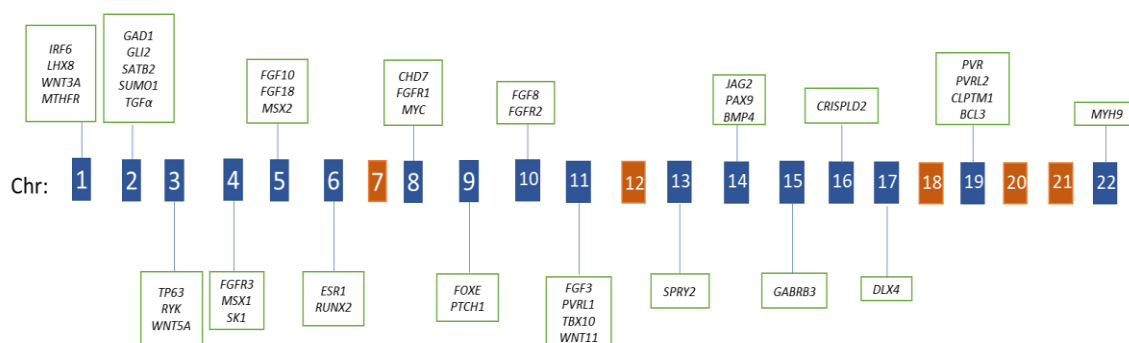


Figura 2- Representação dos 22 cromossomos autossomos e os *loci* identificados e associados com o desenvolvimento de FOTNS; Chr= cromossomo; em laranja= representação dos cromossomos em que não foi descrita variantes associadas com o fenótipo de FOTNS. Fonte: Saleem et al., (2019).

Apesar do avanço na compreensão dos mecanismos que participam no desenvolvimento craniofacial, ainda é incerto o quanto da variação fenotípica das FOTNS pode ser explicado pelos *loci* já identificados, uma vez que, em seu conjunto, eles respondem por apenas de 20 a 25% da herdabilidade destas anomalias (SALEEM et al., 2019). Globalmente observa-se que as FOTNS podem recorrer em famílias (20%) ou aparecer de forma esporádica (80%) (SALEEM et al., 2019) (Figura 1).

As FOTNS têm prevalência de 1:700 a 1000 nascidos vivos, variando de acordo com a etnia e a região geográfica do nascimento (BEATY; MARAZITA; LESLIE, 2016; MACHADO et al., 2018; MOSSEY; MODELL, 2012). Mundialmente, as taxas mais altas são observadas no continente asiático, principalmente na China e Japão, com incidência de 1 em 500 nascidos vivos. Na China, esta condição afeta mais de 2,6 milhões de pessoas (SALEEM et al., 2019).

No Brasil, representam a terceira causa mais prevalente de anormalidades congênitas entre os nascidos vivos (NV), ficando atrás apenas dos defeitos de membros (24,4 casos por 10 mil NV) e das cardiopatias congênitas (8,4/10 mil NV). A prevalência das FO no país como um todo é de 6,1/10 mil NV, variando de 4,13/10 mil NV no estado do Rio de Janeiro a 9,4/10 mil NV no Tocantins. Essa prevalência é comparável à observada no continente asiático (BRASIL, 2021) (Figura 3).

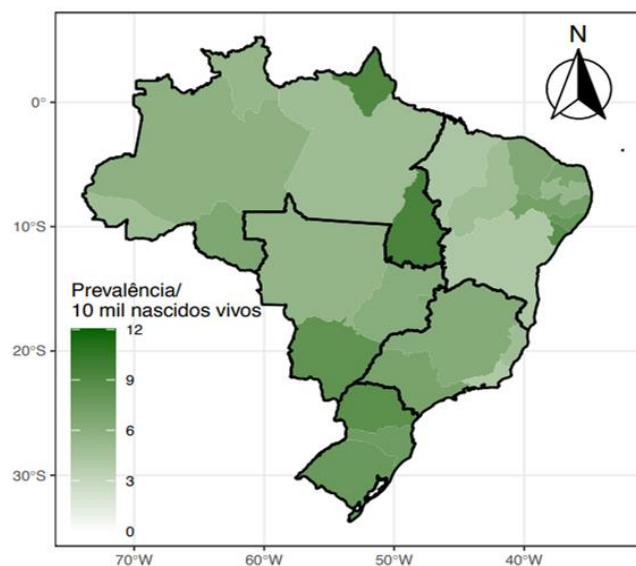


Figura 3 - Prevalência de FO no Brasil. Fonte: Boletim epidemiológico. Vol. 52, nº06, 2021.

Por outro lado, as FOTS têm etiologias cromossômica, monogênica e teratogênica (Figura 1). De acordo com o *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) mais de 900 síndromes têm como fenótipo um dos tipos de FO (OMIM, 2022). Essas síndromes acometem até 65 pessoas por 100 mil ($<1,3:2000NV$) e, portanto, são classificadas como doenças raras de acordo com o conceito adotado pelo Ministério da Saúde do Brasil (FÉLIX et al., 2022). A SVW é reconhecidamente a condição clínica mais comum entre as formas sindrômicas, responsável por 2% de todos os casos de FOT (URAL et al., 2019).

2.3. Implicações do gene *IRF6* em fendas orofaciais típicas

Entre os mais de 30 genes reconhecidamente associados com FOT (Figura 2), o gene *IRF6* está entre os mais investigados por estar implicado tanto em FOTNS familiares quanto na SVW e Síndrome do Pterígio Poplíteo. Esta última, apresenta quadro clínico multissistêmico e facilmente distinguível das FOTNS (BEZERRA et al., 2020; LESLIE et al., 2016b; MACHADO et al., 2018), razão pela qual não foi abordada nesta pesquisa.

A Síndrome de Van der Woude (SVW), com padrão de herança mendeliana autossômica dominante, tem na presença de pits/fossetas/depressões ou elevações no lábio inferior sua característica distintiva para o diagnóstico clínico (BURDICK, 1986; VELÁZQUEZ-ARAGÓN et al., 2021). Pacientes com fenótipo clássico de SVW, cerca de 75% dos casos, apresentam essas anomalias bilateralmente na região paramediana, porém também são observados casos unilaterais e bilaterais assimétricos (RIZOS; SPYROPOULOS, 2004).

Em 26% dos pacientes ocorre algum tipo de fenda oral aberta, seja fenda do lábio (FL), fenda do palato (FP) ou de ambos (FLP) (ALLAM; HAREDY, 2021; NOPOULOS et al., 2007). Outras características são fenda submucosa do palato, úvula bífida, anormalidades do músculo orbicular *oris*, anquiloglossia, hipodontia e anormalidades das glândulas exócrinas (salivares e pancreática) (ALLAM; HAREDY, 2021; NOPOULOS et al., 2007; SCHUTTE et al., 2022).

O fenótipo sutil, a expressividade variável intrafamiliar e a penetrância incompleta contribuem para que muitos indivíduos afetados sejam diagnosticados, *a priori*, como tendo FOTNS, especialmente quando a análise do heredograma não sugere padrão clássico de herança autossômica dominante (GOWANS et al., 2017; VELÁZQUEZ-ARAGÓN et al., 2021). Neste sentido, Leslie et al., (2016) recomendam atenção especial

a famílias que segregam diversos tipos de FOT (“*mixed clefts*”) em diferentes gerações, as quais podem corresponder ao padrão autossômico dominante.

Em 70% dos casos, a SVW é causada por variantes na região codificante do fator regulatório do interferon 6 (*IRF6*; VWS1, OMIM #119300). Variantes de ganho de função do gene que codifica o fator de transcrição tipo *grainyhead 3* (*GRHL3*; VWS2, OMIM # 606713) respondem por 5% dos casos. Os outros 25% estão relacionados com outros genes ou com etiologia não reconhecida (PEYRARD-JANVID et al., 2014).

O gene *IRF6* (ENST00000117595), *locus* 1q32.2, pertence a uma família de nove fatores reguladores transcricionais de interferon. Ele é composto por 9 *exons* sendo que os *exons* 1, 2 e a região terminal do *exon* 9 não são codificantes. A proteína IRF6 contém 467 aminoácidos (ENST00000367021.8), possui um domínio N-terminal de ligação ao DNA e um domínio C-terminal de ligação a proteínas (Figura 4). Sabe-se que sua deficiência leva a malformações craniofaciais, de pele, membros, anormalidades dentárias (BEZERRA et al., 2020; DESMYTER et al., 2010; OMIM, 2022), das glândulas salivares e de outras glândulas exócrinas (METWALLI et al., 2018).

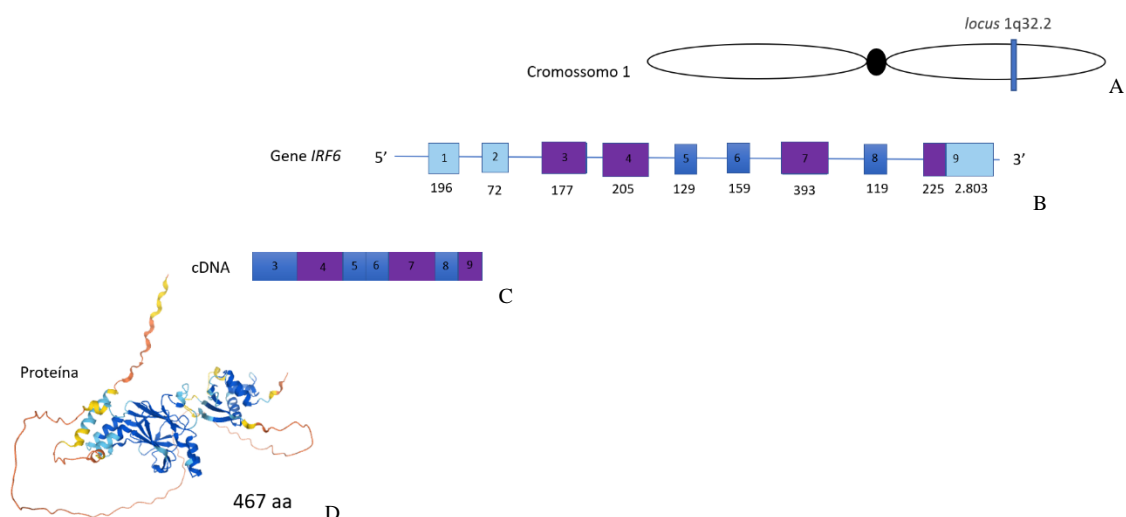


Figura 4 – Gene *IRF6*: localização, constituição, codificação e estrutura proteica. A= ideograma do cromossomo 1 onde se localiza o gene *IRF6*; B= representação do gene e os 9 *exons* que o compõem e quantidade de nucleotídeos. Em lilás: regiões codificantes consideradas *hot spots* do *IRF6* (*exons* 3, 4, 7 e região inicial do *exon* 9). Em azul escuro (*exons* 5, 6 e 8): regiões codificantes. Em azul claro (*exons* 1, 2 e região terminal do *exon* 9): regiões não codificantes; C= cDNA do *IRF6*; D= proteína IRF6 com 467 aminoácidos. Fontes: (FERREIRA DE LIMA et al., 2009; GOWANS et al., 2017; ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/IRF6>) (Adaptado).

De acordo com o *The Human Gene Mutation Database* versão *professional* 2021.4 (HGMD), até 14/08/2022, 369 variantes foram identificadas no gene *IRF6*. Entre

estas, 30 têm sido associadas à FOTNS e 235 ao fenótipo SVW, as demais estão relacionadas à SPP ou com associação indefinida.

Embora a grande maioria das variantes identificadas em casos de FOTNS estejam relacionadas à maior suscetibilidade, variantes patogênicas foram descritas em famílias que segregam FOTNS com padrão autossômico dominante (LESLIE et al., 2015). Neste sentido, Desmyter et al., (2010) sugerem que o gene *IRF6* seja sempre rastreado nessas famílias quando houver dúvidas sobre a normalidade do lábio inferior de um paciente com FOTNS.

Em termos gerais, o fenótipo da SVW tem sido predominantemente associado com variantes com efeito de perda de função por haploinsuficiência que resultam no truncamento da proteína IRF6 (FERREIRA DE LIMA et al., 2009). Entre as 235 variantes associadas com o fenótipo de SVW, estão descritas variantes do tipo *missense*, *nonsense*, *frameshift*, alterações em sítio de *splice*, inserções/deleções (*indels*) e microdeleções cuja distribuição não é aleatória ao longo do gene *IRF6* (ALADE et al., 2020; FERREIRA DE LIMA et al., 2009; GOWANS et al., 2019; LESLIE et al., 2013, 2016).

Em 70% dos casos, essas diferentes alterações ocorrem nos *exons* 3 e 4 ou nos *exons* 7 e 9, com maior concentração no *exon* 4. Esses dados sugerem que o *exon* 4 pode ter uma função principal dentro do domínio de ligação ao DNA e reforçam a hipótese da existência de *hot spots* (FERREIRA DE LIMA et al., 2009; GOWANS et al., 2019; LESLIE et al., 2013). Contudo, mais recentemente, estudos funcionais com embriões de *zebrafish* revelaram que apenas 15 entre 30 variantes *missense* localizadas nos *hot spots* se mostraram patogênicas e que 11 destas estavam localizadas nos *exons* 7 a 9, colocando em questão a importância do *exon* 4 (LESLIE et al., 2013; LESLIE 2016; ALADE et al., 2020).

2.4. Atenção à saúde de pessoas com fendas orofaciais no SGC/HUPAA-UFAL

O SGC/HUPAA-UFAL mantém um ambulatório específico para pessoas com fendas orofaciais desde 2009 (MONLLEÓ et al., 2013). As famílias atendidas neste ambulatório integram um estudo multicêntrico denominado Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais (BBAC) composta por uma base de dados clínicos e um biorrepositório vinculados ao PCFB (FONTES et al., 2013; GIL-DA-SILVA-LOPES et al., 2020; MONLLEÓ et al., 2017; VOLPE-AQUINO et al., 2018). Os dados reunidos pelo

SGC/HUPAA-UFAL representam a maior e mais abrangente fonte de informações clínicas e genéticas sobre fendas orofaciais em Alagoas.

Um estudo realizado em 2016 a partir de dados da BBAC incluindo pacientes oriundos do SGC/HUPAA-UFAL, concluiu que o haplótipo *IRF6* G/A (rs2235371/rs642961) está relacionado com aumento do risco de FOTNS na população brasileira (DE SOUZA et al., 2016). Desde então, nenhuma outra abordagem envolvendo o gene *IRF6* foi realizada com famílias de Alagoas.

Curiosamente, entre os 375 casos de FOT registrados no SGC/HUPAA-UFAL até agosto de 2021, apenas um teve diagnóstico clínico de SVW, embora esta seja a síndrome mais frequente entre as FOTS. Outro aspecto interessante, e ainda não explorado, é que em 97 casos de FOTNS o fenótipo é recorrente, compreendendo situações de famílias com transmissão vertical, horizontal e aleatória, com diferentes tipos de FOT (“*mixed clefts*”), aspecto sugestivo de um forte componente genético.

Considerando que o gene *IRF6* está envolvido tanto na etiologia das FOTNS quanto da SVW, esta pesquisa se propôs a caracterizar o perfil clínico das FOTNS e da SVW em Alagoas e investigar o envolvimento do *IRF6* nesses fenótipos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Descrever o perfil genético-clínico de pacientes com FOT oriundos do ambulatório de genética craniofacial do SGC/HUPAA-UFAL.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever as características sociodemográficas, clínicas e familiares das FOTNS;
- Analisar o gene *IRF6* em casos familiares de FOTNS e SVW;
- Classificar as variantes identificadas e estabelecer a correlação genótipo/fenótipo nos casos com variantes patogênicas.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos: A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, como emenda ao protocolo “Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais-BBAC” (CAAE 85020018.8.3015.5013). A coleta de dados foi condicionada à assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre Esclarecido) e, quando pertinente, do TALE (Termo de Assentimento Livre Esclarecido) que se encontram arquivados no SGC/HUPAA-UFAL.

4.2 Delineamento do estudo: transversal, observacional e descritivo.

4.3 População estudada:

A Figura 5 apresenta sumariamente todas as etapas de seleção da amostra e recortes para alcançar os objetivos propostos.

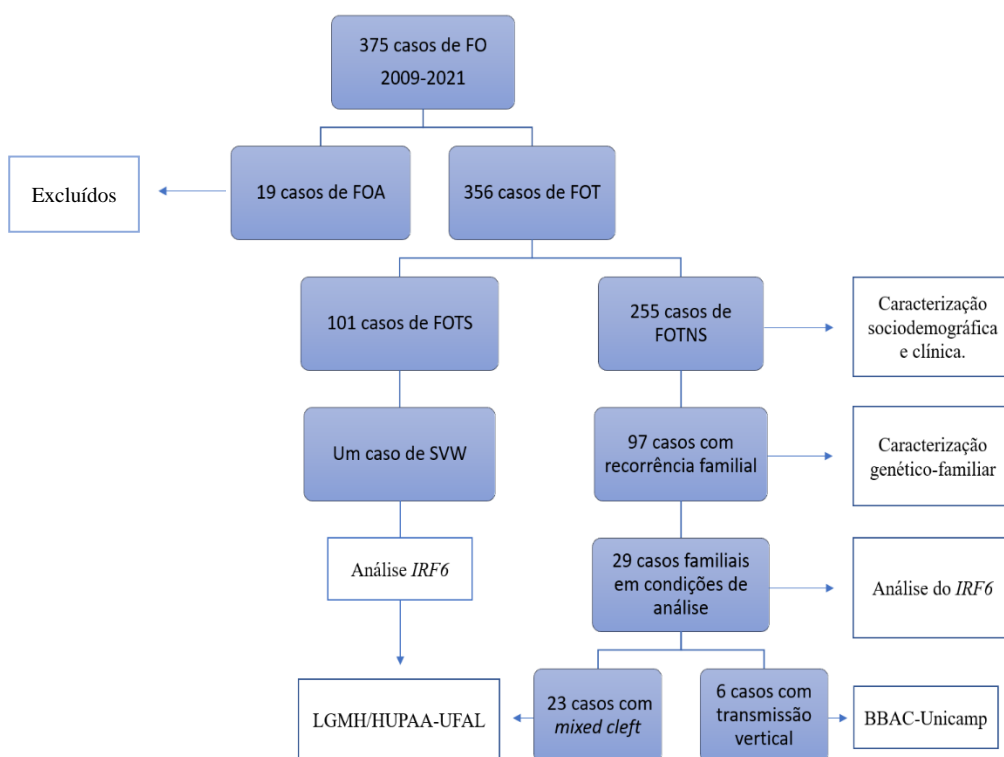


Figura 5 - Etapas de seleção da casuística para descrição sociodemográfica, clínica e investigação molecular dos casos atendidos no SGC/HUPAA-UFAL. FO= Fenda orofacial; FOA= Fenda orofacial atípica; FOT= fenda orofacial típica; FOTS= fenda orofacial típica síndrome; FOTNS= fenda orofacial típica não síndrome; SVW= Síndrome de Van der Woude; LGMH= laboratório de genética molecular humana; HUPAA=Hospital Universitário Professor Alberto Antunes; UFAL= Universidade Federal de Alagoas; BBAC= Base brasileira de anomalias congênitas; Unicamp= Universidade Estadual de Campinas; *mixed cleft*= tipos diferentes de FO.

Como se pode observar, a população do estudo compreendeu 375 pacientes com diagnóstico clínico de FO atendidos no ambulatório de genética craniofacial do SGC/HUPAA-UFAL, no período de agosto de 2009 a agosto de 2021, cadastrados na BBAC. Dezenove casos de FOA foram excluídos por escaparem do escopo da pesquisa.

4.3.1. Critérios de seleção da amostra para descrição características sociodemográficas, clínicas e familiares:

No grupo de 356 casos de FOT, foram selecionados 255 casos não sindrômicos com base na definição descrita por Monlleó et al., (2013) *apud* Mastroiacovo et al., (2011), segundo a qual a FOTNS não é acompanhada de defeitos *major* em outros sítios anatômicos, embora possam ocorrer defeitos *minor* desde que estes não configurem uma síndrome reconhecida. As informações para esta análise foram extraídas da BBAC.

4.3.2. Critérios de seleção da amostra para análise do gene *IRF6*

No grupo de 255 casos de FOTNS, foram selecionados 97 participantes pertencentes a famílias com recorrência de FOTNS. Após a exclusão de casos com material biológico insuficiente e sem condições de coleta, a amostra totalizou 29 participantes com FOTNS pertencentes a 27 famílias. No grupo de 101 casos de FOT sindrômica, apenas um tinha diagnóstico clínico de SVW e foi selecionado. A amostra final para estudo do gene *IRF6* foi de 30 casos-índice.

Desta amostra, 24 (23 com FOTNS e um com SVW) foram estudados no LGMH/HUPAA-UFAL. Os seis casos restantes com FOTNS, têm transmissão genitor(a)-filho(a) e entraram no protocolo *Sequenciamento completo de exoma em casos de fendas orais selecionados na Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais* (CAAE 85020018.8.0000.5404; FAPESP # 2018/21370-4), por meio de parceria com a Universidade Estadual de Campinas.

4.4 Experimentos

Para os 24 participantes com análise molecular no LGMH/HUPAA-UFAL foram realizadas as reações em cadeia da polimerase (PCRs) dos nove *exons* do *IRF6* e posterior reação de sequenciamento seguida de eletroforese capilar.

4.4.1 Extração de DNA

Foi realizada a extração de DNA a partir de sangue total periférico pelo método orgânico por digestão com proteinase K e posterior purificação com fenol-clorofórmio, conforme De-Araújo et al., (1996). O DNA genômico extraído foi quantificado em espectrofotômetro *BioDrop Resolution Life Science version 2.10.0.0*, considerando concentração de 100 a 200 ng adequada para PCR, e sua integridade analisada através da eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Para o preparo do gel, foi utilizado o tampão Tris/Borato/EDTA (TBE), assim como para a realização da eletroforese. Após esta etapa, foi necessário corar o gel em uma solução de Brometo de Etídio (0,5µg/mL), analisá-lo em transluminador de bancada UV (*Benchtop UV Transilluminator UVP®*), fotografá-lo em câmera *Cannon® PowerShot A2500* pertencente ao conjunto de equipamentos *PhotoDoc-It™ Imaging System UVP®* e a imagem obtida foi arquivada para análise.

4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos foram os mesmos utilizados por Ferreira de Lima et al., (2009) para a amplificação dos nove *exons* do *IRF6* e podem ser observados no Quadro 1.

As PCRs foram realizadas em termociclador (*Eppendorf Mastercycler®*). As concentrações de reagentes e temperaturas utilizadas para amplificação dos nove *exons* do *IRF6* estão apresentadas no Quadro 2.

Quadro 1- Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos nove *exons* do *IRF6*.

Oligonucleotídeos	Sequência 5'- 3'	TA (°C)	Tamanho do Amplicon (pb)
<i>EXON 1 – sense</i>	GAAGCGGAGGAGTAGGGT	52	537
<i>EXON 1 – antisense</i>	ATCTGGAAAAGGGCGACAG	52	
<i>EXON 2 – sense</i>	TTATTCTAGGGCTTCTGAG	45	381
<i>EXON 2 – antisense</i>	AAAGTTATGGAAACAGCAAC	47	
<i>EXON 3 – sense</i>	GGCTAGAGCATGAAGTGTA	49	557
<i>EXON 3 – antisense</i>	ATGCC CCC AAA AGA GGA AT	51	
<i>EXON 4 – sense</i>	TCTGGGCAATGATAGGAC	47	373
<i>EXON 4 – antisense</i>	GGCTTTCTTGCTTTATCCA	47	
<i>EXON 5 – sense</i>	CAGTGAATCTAGGGAGGTCC	51	425
<i>EXON 5 – antisense</i>	GCTTTCAGGGCAGTGGTGG	55	
<i>EXON 6 – sense</i>	CAGTGTTTGGTCTTGTCTA	47	432
<i>EXON 6 – antisense</i>	TTACTTCTCCCTGGTGAC	48	
<i>EXON 7 – sense</i>	GTGGCCTTCCTGAATGCTG	53	647
<i>EXON 7 – antisense</i>	CTTGACCTCCTCCAGACTAA	50	
<i>EXON 8 – sense</i>	AAAGATGGTATTTGTTGAGT	44	435
<i>EXON 8 – antisense</i>	GTTTCAGCAAGACTCTAAG	45	
<i>EXON 9 – sense</i>	GTCTTCCTCAGGGCCTCTT	52	466
<i>EXON 9 – antisense</i>	GCATATTTGGAGAATCACAAAC	48	

TA= temperatura de anelamento; °C= graus Celsius; pb= pares de base.

Quadro 2- Condições e reagentes para a amplificação dos *exons*.

Reagente	Concentração	Ciclo
H ₂ O	*μl	94°C – 5'
Tampão	10x	
MgCl ₂	50μM	94°C – 1'
DNTP	2μM	
Primer <i>sense</i>	20pmol	**Anelamento – 1'
Primer <i>antisense</i>	20pmol	
BSA	1%	72°C – 1'
<i>Taq DNA polimerase</i>	5U	
DNA	100-200ng	72°C – 5'
		15°C – Infinito

*μl= microlitros de H₂O para completar 30μl; **Temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos do *exon* 1= 62°C; *exon* 2=50°C; *exon* 3= 53°C; *exon* 4= 49°C; *exon* 5=57°C; *exon* 6=53°C; *exon* 7= 57°C; *exon* 8=53°C; *exon* 9= 54°C; MgCl₂= Cloreto de magnésio; DNTP= Desoxinucleotídeos Trifosfatos; BSA *Albumin Bovine Serum*; *Taq: Thermus aquaticus*; μM= micromolar; pmol=picomol; U: unidade; (') = minutos.

Foram realizadas as reações em cadeia da polimerase (PCRs) dos nove *exons* do *IRF6* contemplando as regiões codificantes e flanqueadoras dos 23 casos familiares e do caso com SVW.

Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados em brometo de etídio, analisados em transluminador de bancada UV, fotografados e arquivados. Esta etapa consistiu na observação do *amplicon* de interesse, com o auxílio de um marcador de peso molecular (*1kb plus DNA Ladder*).

Em seguida, as PCRs foram purificadas com *PureLink® Purification Kit* da *Invitrogen*, seguindo protocolo do fabricante e posteriormente quantificadas para a reação de sequenciamento.

4.4.3 Reação de sequenciamento e eletroforese capilar

As reações de sequenciamento foram realizadas pelo método de Sanger conforme Fabbri et al., (2013). Após a reação de sequenciamento, os produtos foram purificados utilizando 10μl *BigDye Xterminator (Invitrogen)* em cada poço da placa, homogeneizado em agitador multiplataformas por 15 minutos, e levados para eletroforese capilar em analisador genético de *DNA ABI 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems®)*.

As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio de *softwares* de acesso gratuito: *Chromas* para análise dos eletroferogramas e *CLC Sequence Viewer* para

alinhamento com a sequência selvagem do gene *IRF6* (ENSG00000117595) disponível em: <http://www.ensembl.org>.

Para classificar a variante como nova ou descrita na literatura, foram consultadas as bases de dados: *HGMD* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), *AbraOm* (banco de variantes brasileiras com banco de dados constituído por: 1.171 genomas [SABE-1171-WGS- hg38] e 609 exomas [SABE-609-WES- hg19]) ([ABraOM: Brazilian genomic variants \(usp.br\)](http://www.abraom.usp.br)), *1000 Genomes Project* (<http://www.internationalgenome.org/>), *Genome Aggregation Database (gnomAD)* (<http://gnomad.broadinstitute.org/>), *dbSNP* ([Home - SNP - NCBI \(nih.gov\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)) e *ClinVar Database* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Para as variantes identificadas descritas como “patogênica” ou “provavelmente patogênica” (RICHARDS et al., 2015), os genitores do caso índice foram convidados a realizar avaliação clínica e investigação da variante em questão, através do sequenciamento de Sanger.

4.5 Análises preditivas *in silico* de variantes novas

Adotou-se a recomendação do *American College of Medical Genetics and Genomics da Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP)* (RICHARDS et al, 2015) para a classificação da variante de acordo com sua patogenicidade. A análise preditiva de variantes novas foi realizada utilizando os *softwares* de livre acesso: *PROVEAN* (<http://provean.jcvi.org/index.php>); *SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)* (<http://sift-dna.org>); *PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping)* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>); *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org/>); *Align GVGD* (<http://agvgd.hci.utah.edu/>); *MutPred-2* (<http://mutpred.mutdb.org>).

4.5.1 *PROVEAN*

PROVEAN é uma ferramenta que prevê o impacto da atividade proteica decorrente da substituição de aminoácidos ou de *indels* (inserções/deleções). Classifica a alteração na proteína como “neutra” ou “deletéria”, apresenta limiar de -2.5. Modificações com *score* >-2.5 são consideradas neutras, enquanto <-2.5 como deletérias (CHOI; CHAN, 2015).

4.5.2 SIFT

O *SIFT* é um programa que busca prever modificações na atividade proteica devido a substituições de aminoácidos e como provavelmente afetará o fenótipo investigado, possui precisão de 60% em suas predições. O programa utiliza algoritmos para prever o comprometimento da proteína, considerando o local e o tipo da troca de aminoácidos. Alterações em regiões mais conservadas na proteína, tendem a ser classificadas como deletérias (SIM et al., 2012). O *score* classifica as variantes em tolerantes ($>0,05$) ou intolerante/deletérias ($<0,05$).

4.5.3 PolyPhen-2

O *score* do *PolyPhen-2* avalia o impacto na troca de aminoácidos predizendo a alteração da função e estrutura da proteína. Tem precisão de 81% (ADZHUBEI et al., 2010). O *PolyPhen-2* possui um *score* variando de 0.0 a 1.0, sendo classificadas as substituições em:

- 0.0 a 0.15 → benignas
- 0.15 a 1.0 → possivelmente deletérias.
- 0,85 a 1.0 → possuem uma maior probabilidade de serem deletérias ou provavelmente deletérias.

4.5.4 Mutation Taster

O *Mutation Taster* difere dos demais porque inclui em seu banco de dados, SNPs (do inglês, *Single nucleotide polymorphisms*) publicamente disponíveis e inserções/deleções do projeto *1000 Genomas*, assim como variantes patogênicas descritas nos bancos de dados “*ClinVar*” e “*HGMD*”. Possui *score* que varia entre 0.0 e 215, quanto mais próximo de 0.0 a variante é considerada neutra e quanto mais próxima de 215, mais deletéria. Este *software* possui precisão de 86% (SCHWARZ et al., 2014).

4.5.5 Align GVGD

O *Align GVGD* investiga variantes de sentido trocado, associando aspectos físico-químicos dos aminoácidos e alinhando várias sequências proteicas para avaliar o impacto na atividade da proteína. A análise consiste em um espectro gerado dentro dos valores de GD: *Graham Difference* e GV: *Graham Variant*, o qual classifica a substituição como deletéria ou neutra. A análise cruzada entre GD e GV resulta em classificadores de C0

(neutra) a C65 (mais deletéria) (MATHE et al., 2006; TAVTIGIAN, 2005), como observado na Figura 6.

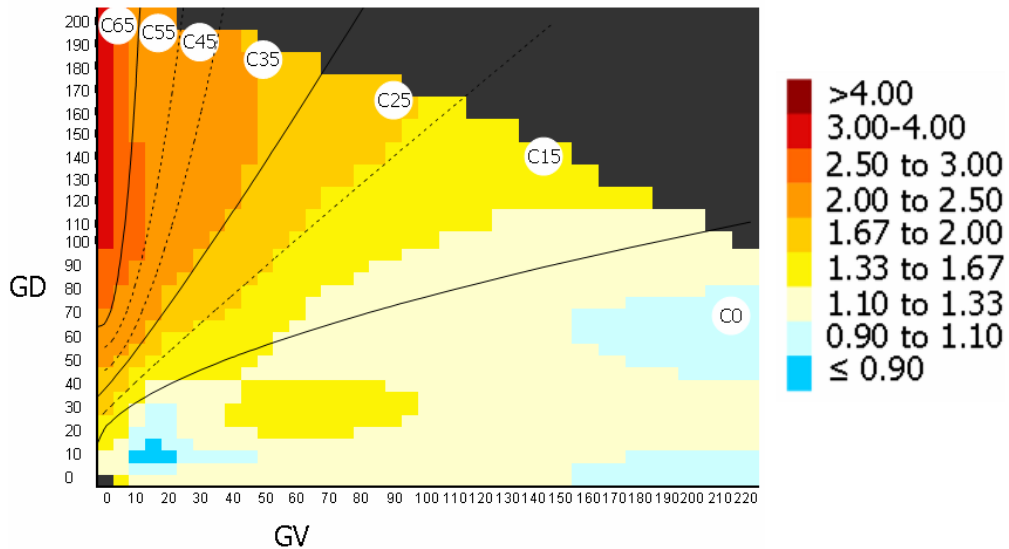


Figura 6 – Representação gráfica do risco estimado de variantes genéticas conforme o *software Align GV GD*. Eixo x= índice GV; eixo y= índice GD; C0 a C65 representando as classes em que cada variante é classificada.

4.5.6 MutPred2

Mutpred2 é um *software* que integra informações genéticas e moleculares para inferir a probabilidade de patogenicidade nas trocas de aminoácidos. Associa-se ao *HGMD*, *SwissVar* e *dbSNP* para elencar uma lista prévia de variantes e seus impactos sobre a proteína. Possui *score* de 0.0 a 1.0, sendo considerada substituição patogênica quanto mais próximo a 1.0 e benigna mais próxima a 0.0 (PEJAVER et al., 2020).

4.6 Análise de conservação

A análise dos sítios de conservação dos aminoácidos alterados da proteína IRF6 humana foi realizada utilizando o programa *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), com informações obtidas no banco de sequências *UniProt* (<http://www.uniprot.org>).

4.7 Análises estatísticas

Os dados sociodemográficos, clínicos e familiares extraídos da BBAC, assim como os dados genéticos obtidos durante os experimentos, foram tabulados utilizando planilha *Excel* e analisados com o auxílio do *software Epi infoTM*. Inicialmente, foi realizada análise descritiva composta por dados sociodemográficos, características clínicas e genéticas.

Tomando por base a maior probabilidade de identificação de variantes patogênicas no gene *IRF6* em famílias com múltiplos afetados, a amostra foi subdividida para verificar o comportamento das variáveis sexo, procedência, classificação e lateralidade das FOTNS, e ocorrência de consanguinidade parental nos grupos FOTNS familiar e FOTNS esporádica.

Para analisar variáveis categóricas, foram empregados o *Teste Exato de Fisher* (F) para variáveis binárias, em tabelas de contingência 2x2, e o *Teste do Qui-quadrado* (χ^2) para variáveis não binárias, em tabelas maiores que 2x2, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

No período de agosto/2009 a agosto/2021, 375 famílias foram atendidas no ambulatório de genética craniofacial do SGC/HUPAA-UFAL com, pelo menos, um indivíduo afetado por fenda orofacial. Entre estes, 19 (5%) apresentavam FOA e 356 (95%) FOT.

Entre os casos de FOT, 255 (71,6%) foram classificados como não sindrômicos (FOTNS) e 101 (28,4%) como sindrômicos (FOTS), tendo um (0,3%) destes o diagnóstico clínico de Síndrome de Van der Woude (SVW). Excluídos os casos de FOA e demais casos sindrômicos, a amostra final foi composta por 256 participantes (255 com FOTNS e um com SVW).

5.1 Epidemiologia descritiva das FOTNS

Entre os 255 casos de FOTNS, a FLP foi mais frequente (128; 51,0%), seguida por FL (62; 24,7%) e FP (61; 24,3%). Somadas às as FLP com as FL, observou-se predomínio unilateral (141;74,2%) e preferência pelo lado esquerdo da face (97; 51,0%).

Quatro pacientes eram filhos adotivos, sendo a história familiar conhecida nos demais 251 casos. Deste total, 154 (61,3%) eram casos esporádicos e 97 (38,7%) familiares. Na maioria das famílias, coexistiam FL, FLP e FP (*mixed clefts*). O número de afetados adicionais ao caso índice variou de um a seis, perfazendo um total de 164 indivíduos, com predomínio de parentes pelo lado materno (86; 52,4%) e do sexo biológico masculino (101; 63,9%). Em 69 (42,1%) famílias, havia parentes de 1º, 2º ou 3º graus afetados, 11 (6,7%) das quais apresentavam transmissão genitor(a)-filho(a) (Tabela 1).

A distribuição dos casos familiares e esporádicos em relação às variáveis sociodemográficas e clínicas é apresentada na Tabela 2. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto aos aspectos sociodemográficos (sexo, procedência e renda familiar).

Em relação às características clínicas, as FLP e FL predominaram no grupo familiar, respectivamente 57 (58,8%) e 26 (26,8%) casos, enquanto as FP, no grupo esporádico (47; 30,5%) ($p=0,014$). Entre os casos com alteração labial (FL e FLP), o acometimento, unilateral/bilateral, esquerdo/direito não diferiu entre os grupos ($p=0,221$).

Devido à baixa idade dos pacientes e eventual sub-registro da informação, a análise do desenvolvimento neuropsicomotor foi possível em 127 participantes e da inteligência em apenas 19. A comparação entre os grupos não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre casos familiares e esporádicos quanto à ocorrência de ADNPM (atraso do desenvolvimento neuropsicomotor) ($p=0,344$) e deficiência intelectual ($p=0,165$).

Por outro lado, houve diferenças entre os grupos quanto à ocorrência de consanguinidade parental que foi mais frequente no grupo familiar ($p=0,020$) e de gemelaridade, com todos os cinco pares de gêmeos da amostra pertencendo ao grupo familiar ($p=0,008$). Destaca-se que entre estes, apenas um par foi concordante para o fenótipo de fenda oral.

Tabela 1- Características dos casos familiares da amostra

Característica analisada a partir do caso índice	N	%
Número adicional de parentes afetados por família (n=97)		
1	56	57,7
2	24	24,7
3	12	12,6
4	2	2,0
5	2	2,0
6	1	1,0
Grau de parentesco (n=164)		
1° grau (pais e irmãos)	19	11,6
2° grau (avós, meios-irmãos, tios (as))	20	12,2
3° grau (primos de 1° grau, bisavós, meios-tios)	30	18,3
4° grau ou superior	95	57,9
Tipo de parentesco (n=164)		
Genitores	11	6,7
Irmãos	8	4,9
Avós	4	2,4
Tios	13	7,9
Primos de 1° grau	15	9,1
Outros	113	68,9
Lado do parentesco (n=164)		
Materno	86	52,4
Paterno	62	37,8
Ambos	16	9,7
Sexo biológico dos parentes afetados (n=158) *		
Masculino	101	63,9
Feminino	57	36,1

* Seis parentes remotos foram referidos como afetados, porém, sem sexo biológico identificado.

Tabela 2- Distribuição das características sociodemográficas e clínicas entre os grupos familiar e esporádico de FOTNS na amostra.

Variáveis	Casos Familiais (n=97)		Casos Esporádicos (n=154)		p-valor	IC
	N	%	N	%		
Sexo do propósito					0,125	0,80-2,42
Masculino	59	60,8	81	52,6		
Feminino	38	39,2	73	47,4		
Procedente da capital					0,13	0,36-1,28
Sim	22	22,7	46	29,9		
Não	75	77,3	108	70,1		
Renda familiar < 2 salários-mínimos					0,07	0,87-2,59
Sim	54	55,7	70	45,5		
Não	43	44,3	84	54,5		
Classificação da FOTNS					0,014	-
FL	26	26,8	36	23,4		
FLP	57	58,8	71	46,1		
FP	14	14,4	47	30,5		
Lateralidade da FL/FLP					0,221	-
Esquerda	37	44,6	60	56,1		
Direita	20	24,1	24	22,4		
Bilateral	26	31,3	23	21,5		
Consanguinidade parental					0,020	1,03-7,41
Sim	14	14,4	9	5,8		
Não	83	85,6	145	94,2		
Gemelaridade					0,008	1,49-indef.
Sim	5	5,2	0	0		
Não	92	94,8	154	100		
ADNPM*					0,344	0,28-2,04
Sim	11	22,4	14	17,9		
Não	38	77,6	64	82,1		
Deficiência intelectual*					0,165	0,01-2,52
Sim	4	50,0	2	18,2		
Não	4	50,0	9	81,8		

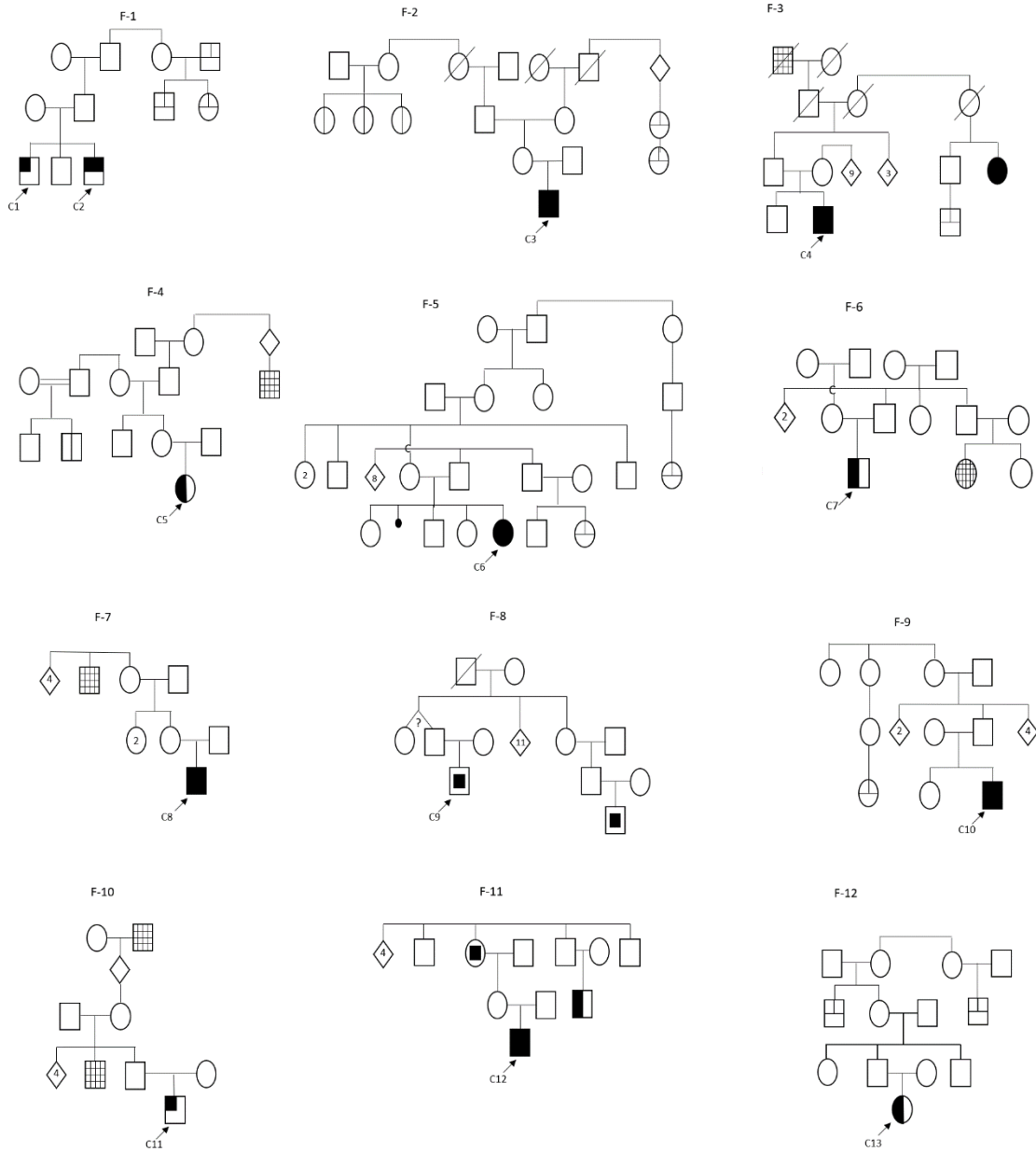
IC= intervalo de confiança; indef.= indeferido, quando não há ocorrência da variável em um dos grupos; FOTNS= fenda oral típica não síndrômica; ADNPM= atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. *A maioria dos pacientes não tinha idade apropriada para avaliação de ADNPM (n=124) e deficiência intelectual (n=232). Houve uma perda de quatro pacientes no n total, isto por serem filhos (a) adotivos, o “n” passou de 255 para 251.

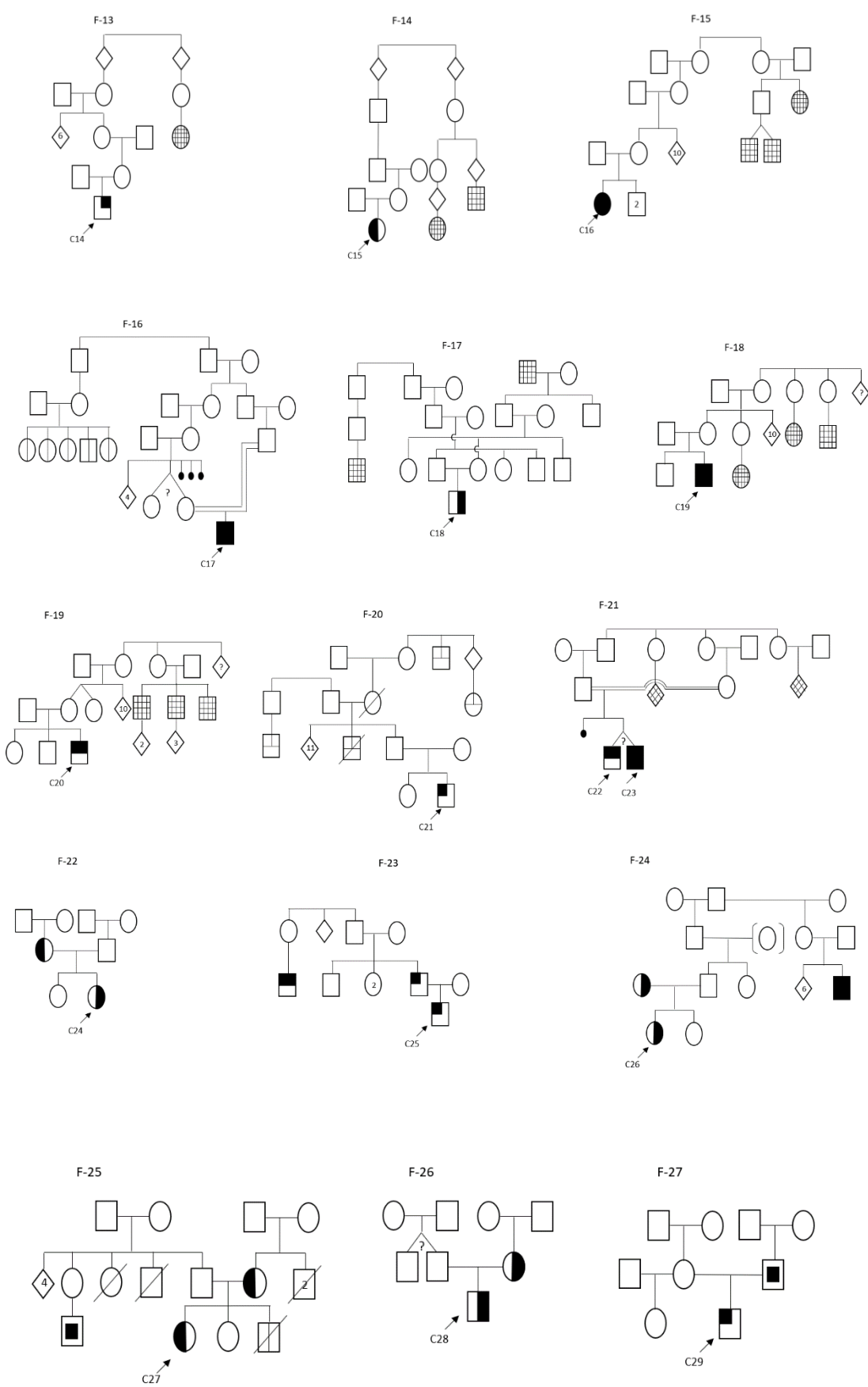
5.2 Análise do gene *IRF6*

5.2.1 Gene *IRF6* nos casos familiares de FOTNS

Entre os 97 casos de FOTNS familiares, 29 (29,9%) tinham material biológico (sangue periférico ou DNA) armazenado e em condições de análise. Estes correspondem a 27 famílias, seis com transmissão genitor(a)-filho(a) (F-22, F-23, F-24, F-25, F-26 e F-27), e três com recorrência entre irmãos (F-1, F-21 e F-25), a F-21 corresponde ao caso gemelar. Em três famílias o parentesco mais próximo era de 2º grau (tio ou avó) (F-10, F-11 e F-20), em sete o parentesco mais próximo era de 3º grau (bisavô, tio-avô, prima de

1º grau) (F-3, F-5, F-6, F-7, F-12, F-17, F-18) e em nove, havia parentes de 4º grau ou superior (F-2, F-4, F-8, F-9, F-13, F-14, F-15, F-16 e F-19) (Figura 7).





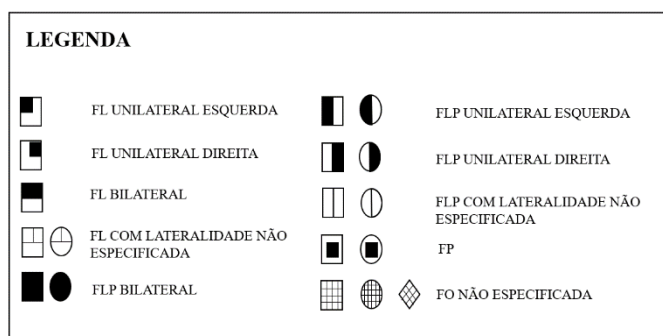


Figura 7- Heredogramas dos 29 casos de FOTNS. F= família; C= caso

Foi realizado o sequenciamento do *exoma* dos 6 casos com transmissão genitor(a)-filho(a) em parceria com a Unicamp. Os resultados referentes ao gene *IRF6* foram inseridos nesta dissertação. Quanto aos 23 casos de FOTNS analisados no LGMH/HUPAA-UFAL, até a presente data, foi possível alcançar resultados satisfatórios com o sequenciamento dos *exons* codificantes do gene *IRF6* (*exons* 3 a 9) em 18 casos índices correspondentes às famílias F-1, F-2, F-3, F-4, F-5, F-7, F-8, F-10, F-11, F-14, F-15, F-16, F-17, F-18, F-19 e F-20. Para 5 famílias/5 casos estas análises ainda estão em andamento. O sequenciamento dos *exons* 1 e 2 apresentou resultados de baixa qualidade na maioria dos casos, os experimentos para a amplificação e sequenciamento dos mesmos estão em processo de repetição para futuras análises (Quadro 3).

Foram identificadas doze variantes, sendo sete exônicas e cinco intrônicas (Tabela 4), todas já registradas nas bases de dados *HGMD*, *ClinVar Database*, *dbSNP*, *Genome Aggregation Database*, *1000 Genomes Project*, *AbraOm*.

Entre as variantes exônicas, três estão localizadas nos *exons* não codificantes, sendo duas no *exon* 1 e uma no *exon* 2, e quatro nos *exons* codificantes, sendo duas no *exon* 5, ambas sinônimas, e duas no *exon* 7 (domínio de ligação à proteína), sendo uma sinônima e a outra *missense*. Todas as variantes foram classificadas como “benignas”, com exceção da *c.759T>C* (*exon* 7), classificada como “benigna” ou “provavelmente benigna” (Tabela 4).

As cinco variantes intrônicas são substituições pontuais de nucleotídeos e estão localizadas nos *introns* 1, 3, 6, 7 e 9. Duas foram classificadas como tendo “significado clínico não reportado” e as outras três classificadas como “benignas” (Tabela 4).

Quadro 3- Resultados do sequenciamento do gene *IRF6* nos casos de FOTNS estudados no LGHM/HUPAA/UFAL:

Código Indivíduo	Código Família	Exons do gene <i>IRF6</i>								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
C1	F-1	c.-313T>A c.-338A>T	RI	WT	WT	c.459G>T	c.667+27C>G	WT	WT	WT
C2	F-1	WT	RI	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
C3	F-2	WT	c.-73T>C	WT	WT	c.459G>T	WT	WT	WT	WT
C4	F-3	c.-313T>A c.-338A>T	WT	WT	WT	c.459G>T	c.667+27C>G	WT	WT	WT
C5	F-4	c.-313T>A c.-338A>T	WT	WT	WT	c.459G>T	c.667+27C>G	WT	WT	WT
C6	F-5	WT	c.-73T>C	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
C7	F-6	WT	c.-75-4A>G	WT	WT	RI	c.667+27C>G	c.1060+37C>T c.820G>A c.759T>C	WT	WT
C8	F-7	WT	c.-73T>C	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
C9	F-8	RI	WT	WT	WT	WT	WT	WT	c.1450+68A>G	WT
C10	F-9	WT	RI	WT	WT	c.459G>T	WT	c.820G>A	RI	WT
C11	F-10	WT	c.-73T>C	WT	WT	WT	WT	WT	RI	WT
C12	F11	RI	RI	c.175-5C>G	WT	c.390G>T	c.667+27C>G	c.1060+37C>T	WT	WT
C13	F-12	RI	WT	WT	WT	RI	WT	WT	WT	WT
C14	F-13	RI	RI	c.175-5C>G	WT	RI	WT	c.1060+37C>T	WT	WT

C15	F-14	c.-313T>A c.-338A>T	c.-73T>C	c.175-5C>G	WT	c.459G>T	WT	WT	WT	WT
C16	F-15	WT	c.-73T>C c.-75-4A>G	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
C17	F-16	RI	c.-73T>C c.-75-4A>G	c.175-5C>G	WT	c.459G>T	c.667+27C>G	WT	WT	WT
C18	F-17	c.-313T>A c.-338A>T	c.-73T>C c.-75-4A>G	c.175-5C>G	WT	c.459G>T	c.667+27C>G	WT	WT	WT
C19	F-18	RI	c.-73T>C c.-75-4A>G	c.175-5C>G	WT	c.459G>T	c.667+27C>G	WT	WT	WT
C20	F-19	RI	c.-73T>C c.-75-4A>G	c.175-5C>G	WT	c.459G>T	WT	WT	WT	WT
C21	F-20	RI	c.-75-4A>G	WT	WT	c.459G>T	WT	c.1060+37C>T	WT	WT
C22	F-21	RI	c.-73T>C c.-75-4A>G	c.175-5C>G	WT	c.390G>T c.459G>T	WT	c.1060+37C>T	WT	WT
C23	F-21	RI	c.-73T>C c.-75-4A>G	c.175-5C>G	WT	RI	c.667+27C>G	c.1060+37C>T	WT	WT

RI: resultados insatisfatórios; WT: *wildtype* (sequência selvagem). Bases de dados utilizadas para pesquisa das variantes: *ClinVar Database*, *dbSNP*, *1000 Genomes Project*, *AbraOm* e *HGMD*.

Tabela 3- Descrição das variantes identificadas nos casos de FOTNS.

Variante	Intron /Exon	Localização no c.DNA	Alteração proteica	Classificação da Variante	Frequência na amostra (Casos detectados/casos analisados)
rs12403006	<i>Exon 1</i>	c.-338A>T	-	Benigna	5/13
rs34743335	<i>Exon 1</i>	c.-313T>A	-	Benigna	5/13
rs2235377	<i>Intron 1</i>	c.-75-4A>G	-	Benigna	9/18
rs861019	<i>Exon 2</i>	c.-73T>C	-	Benigna	12/18
rs7552506	<i>Intron 3</i>	c.175-5C>G	-	Benigna	9/23
rs34907424	<i>Exon 5</i>	c.390G>T	p.Gly130=	Benigna	2/19
rs2013162	<i>Exon 5</i>	c.459G>T	p.Ser153=	Benigna	12/19
rs2235375	<i>Intron 6</i>	c.667+27C>G	-	Benigna	9/22
rs41303263	<i>Exon 7</i>	c.759T>C	p.Tyr253=	Benigna/Provavelmente benigna	1/23
rs2235371	<i>Exon 7</i>	c.820G>A	p.Val274Ile	Benigna	2/23
rs2235373	<i>Intron 7</i>	c.1060+37C>T	-	Significado clínico não reportado	6/23
rs145873101	<i>Intron 9</i>	c.1450+68A>G	-	Significado clínico não reportado	1/21

5.3 O gene *IRF6* na Síndrome de Van der Woude

Além dos 29 casos de FOTNS, estava disponível o material biológico do único caso de SVW perfazendo os 30 indivíduos da amostra selecionada para estudo molecular. Neste, foi identificada a variante nova *missense* p.Phe266Ser. Os resultados da análise preditiva *in silico*, de conservação e a modelagem da proteína serão apresentados sob a forma de artigo no item 6.3.

6. DISCUSSÃO

As FOT estão entre as malformações humanas mais frequentes, ocorrem em todos os continentes com uma incidência tão alta quanto um caso a cada dois minutos e meio, os fenótipos compreendem as FLP, FL e FP (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Predominantemente com etiologia multifatorial, essas malformações congênitas representam um desafio tanto à pesquisa sobre etiologia quanto para o cuidado à saúde.

6.1. Epidemiologia descritiva dos casos de FOTNS

Do ponto de vista epidemiológico, dados oriundos de estudos europeus e norte-americanos indicam que as FLP e FL são mais comuns no sexo masculino com proporção 2:1 e as FP no sexo feminino com proporção 2:1 (LESLIE et al., 2016; SALEEM et al., 2019). Em relação à topografia das FOTNS, as fendas unilaterais são mais comuns, observadas em 75% dos casos. As que acometem o lado esquerdo da face são duas vezes mais frequentes quando comparadas com as unilaterais direitas e com as bilaterais (BEATY; MARAZITA; LESLIE, 2016; GUNDLACH; MAUS, 2006).

Na presente amostra, a ocorrência de 71,6% de FOTNS foi compatível com o esperado (LESLIE et al., 2016; SALEEM et al., 2019). No grupo FOTNS, o sexo masculino foi o mais afetado, houve predomínio de FLP seguido por FL e FP, e preferência de acometimento unilateral esquerdo, resultados concordantes com a literatura (LESLIE et al., 2016; SALEEM et al., 2019).

Estes resultados indicam que a amostra é representativa da população, embora seja oriunda de um ambulatório especializado em genética. Na maioria dos serviços de genética, predominam casos de FOTS, o que introduzem vieses de seleção, resultando em predomínio de FP e de fenótipos mais graves, com a maior parte dos casos de ocorrência

esporádica. A representatividade da amostra desta pesquisa reflete o fato de que o ambulatório de genética craniofacial do SGC/HUPAA-UFAL foi concebido e implantado no bojo do Programa de Pesquisas para o SUS (PPSUS) como porta de entrada para a atenção especializada a pessoas com fendas orais em Alagoas, independentemente do tipo e da gravidade da malformação (MONLLEÓ et al., 2017).

Na população em geral, 20% das FOTNS são familiares e 80% esporádicas (MOSSEY; MODELL, 2012; SALEEM et al., 2019). Na presente amostra, os casos familiares corresponderam a 38,6%, quase o dobro do esperado com base na literatura (MOSSEY et al., 2012).

É possível que a alta frequência de parentes afetados observada nesta casuística reflita a atenção dada pelos especialistas em genética médica à coleta da história familiar em todos os casos, o que incluiu o registro de no mínimo três gerações, ou seja parentes do primeiro ao terceiro grau (Tabela 1).

Observou-se também o predomínio de parentes com FLP, relacionados entre si pelo lado materno do probando. Este resultado, além de refletir a maior prevalência de FLP na amostra, pode estar relacionado aos diferentes limiares de susceptibilidade, característica típica de fenótipos multifatoriais que, no caso das FLP e FL é mais alto no sexo feminino (MOSSEY et al., 2009; SALEEM et al., 2019). Assim, infere-se que a presença de maior número de indivíduos masculinos com FLP aparentados pelo lado materno seja um indicativo de maior contribuição do componente genético nestas famílias, o que poderia justificar a relação do tipo de FOTNS e o lado de parentesco.

A comparação entre os grupos esporádico e familiar de FOTNS revelou diferenças estatisticamente significativas quanto à maior ocorrência de FL com ou sem FP (FL/P) ($p=0,014$), consanguinidade parental ($p=0,02$) e gemelaridade ($p=0,008$) no grupo familiar. Estes resultados também reforçam uma maior participação do componente genético no fenótipo multifatorial nessas circunstâncias.

A consanguinidade parental é um fator de risco conhecido em distúrbios genéticos autossômicos por aumentar a probabilidade de homozigose de alelos recessivos associados a estas doenças. No entanto, a FOTNS é uma condição multifatorial e a literatura apresenta resultados divergentes quanto a associação de consanguinidade com o desenvolvimento do fenótipo. Sabe-se que mesmo em populações com altas taxas de casamento consanguíneo, a frequência de FOTNS é similar ou consideravelmente mais baixa do que em outras populações (SABBAGH et al., 2014). Em contrapartida, Silva et al., (2019), em estudo desenvolvido no sudeste brasileiro, apontaram a consanguinidade

como fator de risco para FOTNS, ressaltando a heterogeneidade das taxas de consanguinidade entre as regiões do país, sendo o nordeste a região com maior prevalência de casamentos consanguíneos. Nesta casuística, a frequência de consanguinidade parental foi alta (9,2%), sendo predominante nos casos familiares, o que corrobora o achado de Silva et al., 2019.

Todos os cinco pares de gêmeos desta casuística estavam no grupo familiar. Embora não tenham sido realizados estudos moleculares para averiguar a zigosidade, quatro foram concordantes quanto ao sexo e apenas um par foi concordante quanto ao tipo de FOTNS.

Alguns estudos têm levantado hipóteses para explicar a discordância fenotípica das FOTNS em gêmeos monozigóticos. Young e Slifer (2021) estudaram gêmeos monozigóticos discordantes e sugeriram que diferentes padrões de metilação do DNA observados nos gêmeos monozigóticos podem estar envolvidos no aparecimento de FOTNS. A metilação do DNA se relaciona diretamente com fatores ambientais como a alimentação. Um exemplo clássico é a ingestão materna de ácido fólico durante a gravidez, a qual fornece um grupo metil favorecendo os processos de metilação, sendo comprovadamente fator protetivo para FOTNS (BUTALI et al., 2013).

6.2. Implicação do gene *IRF6* nos casos familiares de FOTNS

Dentre os 97 casos familiares de FOTNS atendidos no ambulatório de genética craniofacial do SGC/HUPAA-UFAL no período agosto/2009 a agosto/2021, apenas 29 puderam ser investigados geneticamente. Esta perda de casuística foi devida, por um lado, à discrepância entre o ano de início da BBAC (2008) e do biorrepositório (2012) e, por outro, à priorização inicial do grupo de pesquisa para estudos com FOTS. Outros motivos que contribuíram para a perda de casos elegíveis para este estudo foram a concentração e volume de DNA insuficientes para investigação molecular, contaminação do material e impossibilidade de coleta, esta última intensificada pelas restrições sanitárias relacionadas à pandemia da COVID-19.

Apesar destas perdas, destaca-se que a amostra corresponde a um terço dos casos familiares e representa 27 famílias. A compreensão da etiologia das FOTNS é assunto frequente nas pesquisas desenvolvidas ao redor do mundo. Atualmente, inúmeros genes têm sido associados a esta condição, entre os quais está o *IRF6* (BEATY; MARAZITA; LESLIE, 2016; SALEEM et al., 2019; VIEIRA et al., 2007).

De acordo com o HGMD versão *professional 2021.4*, até 14/08/2022, 369 variantes foram identificadas no gene *IRF6* (NM_006147.4). Várias destas correspondem a SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) que não são causativas, porém conferem maior suscetibilidade às FOTNS. Entre as variantes causativas, destacam-se aquelas relacionadas ao fenótipo da SVW.

Esta síndrome, de herança autossômica dominante, é um bom exemplo de FOTS que pode ser subdiagnosticada devido à sua grande variabilidade fenotípica. Desmyter et al., (2010) reclassificaram 3% de 95 pacientes com FOTNS para SVW após a identificação de variantes causativas no gene *IRF6*. Um dos pacientes tinha um diminuto orifício mediano na mucosa do lábio inferior que apenas foi identificado após reexame clínico motivado pelo resultado da análise molecular. Com base nesse resultado, os autores sugerem que o *IRF6* seja rastreado em todas as famílias com FOTNS de transmissão autossômica dominante ou sempre que exista dúvidas a respeito da integridade dos lábios de um paciente.

Até o momento, nenhuma das 27 famílias com FOTNS estudadas apresentou variantes patogênicas no gene *IRF6*. A análise deste gene está completa em apenas 4 famílias com FOTNS e nas seis com transmissão genitor(a)-filho(a), situação sugestiva de padrão autossômico dominante. A ausência de variantes patogênicas nestas famílias, pode ser devida ao pequeno número de casos, mas também pode refletir a consistência do exame clínico-dismorfológico realizado no ambulatório de genética craniofacial do SGC/HUPAA-UFAL pelo qual não havia suspeita clínica de SVW nesses participantes. Conclusões sobre a ausência de variantes patogênicas nas demais 14 famílias não serão possíveis até que o sequenciamento completo do gene *IRF6* esteja finalizado.

Todas as variantes identificadas até o momento estão catalogadas na base *ClinVar*, uma classificada como benigna ou provavelmente benigna, três sem significado clínico e nove benignas. Os critérios para esta classificação seguem os parâmetros do ACMG/AMP e *ClinGen*. São ditas variantes “benignas” os polimorfismos comuns na população, com frequência >1%, enquanto as “sem significado clínico” são aquelas que ainda não possuem elucidação sobre o real impacto na proteína.

6.3 Artigo: Descrição de uma variante patogênica nova no gene *IRF6* em um caso de Síndrome de Van der Woude.

Neste capítulo será apresentada a íntegra do artigo em elaboração a ser submetido à revista *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* (Qualis Capes 2013-2016: B3 para área de Medicina I e II, Qualis Capes unificado: A4. Fator de Impacto/JCR: 1.915).

DESCRIÇÃO DE UMA VARIANTE NOVA PATOGÊNICA DO GENE *IRF6* EM UM CASO DE SÍNDROME DE VAN DER WOUDE

Nome dos autores: Rayane Ferreira da Silva^{1,2,4}; Reginaldo José Petroli^{1,5}; Débora de Paula Michelatto^{1,5}; Isabella Lopes Monlleó^{1,2,3,4,5}.

Filiação institucional: Universidade Federal de Alagoas (UFAL)¹; Instituto de Ciências Biológicas da Saúde (ICBS)²; Serviço de Genética Clínica dos Hospital Universitário da UFAL³; Programa de Pós-graduação de Ciências da Saúde (PPGCS/ICBS)⁴; Faculdade de Medicina (FAMED/UFAL)⁵.

Dados autor correspondente

Nome: Isabella Lopes Monlleó

Endereço: Avenida Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, Maceió-AL. CEP 57072-900

Telefone: +55 82 3202-3774

Fax: +55 82 3202-3774

Endereço de email: isabella.monlleo@famed.ufal.br

Declaração de conflito: Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Resumo

O objetivo deste relato é descrever e analisar a patogenicidade da variante nova p.Phe266Ser identificada no gene *IRF6* em um caso esporádico de Síndrome de Van der Woude. A criança apresenta fenótipo clássico com fenda labiopalatina bilateral e elevações paramedianas no lábio inferior. A variante c.797T>C (TTT/TCT) foi identificada no *exon 7*, em heterozigose, através de sequenciamento de Sanger. Considerando a análise de conservação, a modelagem da proteína e a pontuação de patogenicidade obtida nas análises *in silico*, sugere-se que a alteração é patogênica. Este relato contribui para ampliar o conhecimento sobre a participação do gene *IRF6* na etiologia das malformações orofaciais.

Palavras-chave: Fissura de lábio, Fissura de lábio e palato, Fissura de palato, Síndrome de Van der Woude, gene *IRF6*.

Introdução

A Síndrome de Van der Woude (SVW; OMIM #119300) é uma doença genética rara com incidência mundial entre 1:35.000 a 1:100.000 nascidos vivos e apresenta clínica altamente variável (LESLIE et al., 2015).

Alterações como pits/fossetas/depressões ou elevações paramedianas no lábio inferior representam uma característica distintiva para o diagnóstico clínico. Essas alterações são as únicas características da síndrome em 44% dos casos, todavia 15% dos casos não as apresentam e cerca de 20% dos casos são assintomáticos (BURDICK, 1986; VELÁZQUEZ-ARAGÓN et al., 2021).

Em 26% dos pacientes ocorre algum tipo de fenda oral aberta, seja fenda do lábio (FL), fenda do palato (FP) ou de ambos (FLP). Podem também ocorrer subfenótipos de fenda oral como anormalidades do músculo orbicular *oris*, fenda submucosa do palato, úvula bífida, anquiloglossia. Desse ponto de vista, afirma-se que até 2% dos pacientes com fenda oral aberta têm diagnóstico de SVW, o que faz desta condição clínica a causa mais comum de fenda oral sindrômica (ALLAM; HAREDY, 2021; NOPOULOS et al., 2007; SCHUTTE et al., 2022). Outras características relacionadas à SVW são hipodontia e anormalidades das glândulas exócrinas (salivares e pancreática) (ALLAM; HAREDY, 2021; NOPOULOS et al., 2007; SCHUTTE et al., 2022).

A SVW apresenta padrão de herança monogênica autossômica dominante, com penetrância estimada de 92% (BURDICK et al., 1985). Na maioria dos casos, alterações patogênicas foram identificadas em uma região crítica do cromossomo 1 onde estão localizados os genes *IRF6* (1q32.2-q41) e *GRHL3* (1p36.11) (LESLIE et al., 2016a), os quais são responsáveis por 70% e 5% dos casos, respectivamente. Os 25% restantes estão relacionados com alterações patogênicas em outros genes ou não têm etiologia reconhecida (PEYRARD-JANVID et al., 2014).

De acordo com o *The Human Gene Mutation Database* (HGMD) versão *professional 2021.4*, até 14/08/2022, 369 variantes foram identificadas no gene *IRF6* (fator regulatório do interferon 6) (NM_006147.4). Entre estas, 235 foram associadas com o fenótipo de SVW, compreendendo variantes do tipo *missense*, *nonsense*, *frameshift*, *sítio de splice*, *inserções/deleções (indels)* e microdeleções cuja distribuição não é aleatória ao longo dos *exons* (ALADE et al., 2020; FERREIRA DE LIMA et al., 2009; LESLIE et al., 2013, 2016).

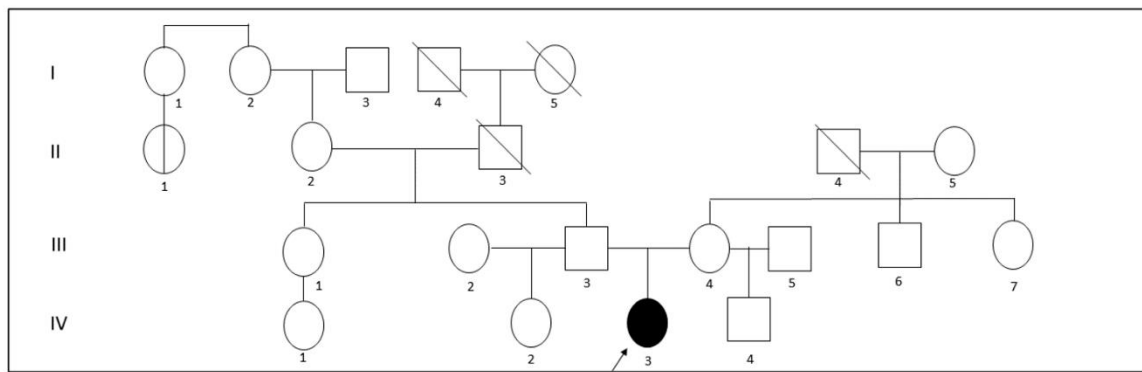
Neste artigo, descreve-se uma variante nova *missense* localizada no *exon 7* do gene *IRF6* e analisa-se sua patogenicidade em uma criança com fenótipo clássico de SVW.

Relato do caso

Criança de sexo biológico feminino, referenciada ao ambulatório de genética craniofacial do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas (AGC/HUPAA-UFAL) para avaliação diagnóstica. É a única filha de casal não consanguíneo, tem uma meia-irmã hígida pelo lado paterno (Figura 1A, IV-2) e um meio-irmão hígido pelo lado materno (Figura 1A, IV-4). Há relato de um parente de 5º grau pelo lado paterno com FLP (Figura 1A, II-1), não acessível para avaliação genético-clínica. A menina é produto de gestação espontânea, não-gemelar, sem intercorrências, mãe com 31 e pai com 36 anos de idade no momento da concepção. Nascida a termo, com peso 2.764g (p3-p15); comprimento 48,5 cm (p<3) e perímetro cefálico 34 cm (p50), evoluiu com sucção débil no período neonatal.

Ao exame físico, aos 4 meses de vida, apresentou peso 6.750g (p50-p85), comprimento 63 cm (p50-p85) e perímetro cefálico 42 cm (p85), assimetria craniana sem sinostose, pregas epicânticas, fenda de lábio e palato bilateral completa, elevações paramedianas no lábio inferior (Figura 1B), pregas palmares variantes, sinéquia dos pequenos lábios, desenvolvimento neuropsicomotor adequado para a idade.

Estabelecido o diagnóstico clínico de SVW, a mãe foi examinada e não apresentou indícios clínicos da síndrome, o pai não estava presente na consulta e foi referido como não afetado. A criança foi encaminhada para a realização do procedimento cirúrgico em um centro de referência para tratamento de anomalias craniofaciais, tendo realizado queiloplastia e palatoplastia parcial, respectivamente, aos 9 e 12 meses de vida (Figura 1C).



A



B



C

Figura 1. A= Heredograma do caso de SVW (indivíduo IV-3); indivíduo II-1: FLP sem lateralidade especificada. B= criança aos quatro meses de idade com fenda de lábio e palato bilateral completa e elevações paramedianas no lábio inferior. C= criança aos 19 meses, evidenciando queiloplastia e elevações paramedianas no lábio inferior.

O DNA genômico foi obtido a partir de sangue total periférico pelo método fenol-clorofórmio (DE-ARAÚJO et al., 1996). O gene *IRF6* foi analisado por sequenciamento de Sanger, conforme Fabbri et al., (2013), utilizando o analisador genético *ABI 3500* (*Applied Biosystems*®).

Os eletroferogramas obtidos foram comparados com a sequência de referência ENSG00000117595 (<http://www.ensembl.org>). A análise da segregação das variantes identificadas foi realizada nas amostras parentais. Os dados moleculares estão sintetizados no Quadro 1.

Quadro 1- Variantes encontradas no caso de SVW e genitores.

Variante	Exon/ Intron	Localização	Alteração proteica	Classificaçã o Clinvar	Segregação		
					Caso índice	Genitor	Genitora
rs12403006	<i>Exon 1</i>	c.-338A>T	-	Benigna	WT/WT	WT/WT	c.-338A>T/ WT
rs34743335	<i>Exon 1</i>	c.-313T>A	-	Benigna	WT/WT	WT/WT	c.-313T>A/ WT
rs2235377	<i>Intron 1</i>	c.-75-4A>G	-	Benigna	WT/WT	WT/WT	c.-75-A>G/ WT
rs2013162	<i>Exon 5</i>	c.459G>T	p.Ser153=	Benigna	c.459G>T/ WT	c.459G>T /WT	WT/WT
rs2235375	<i>Intron 6</i>	c.667+27C>G	-	Benigna	c.667+27C >G/ c.667+27C >G	c.667+27 C>G/WT	c.667+27C >G/WT
-	<i>Exon 7</i>	c.797T>C	p.Phe266Ser	-	c.797T>C/ WT	WT/WT	WT/WT
rs2235371	<i>Exon 7</i>	c.820G>A	p.Val274Ile	Benigna	c.820G>A/ WT	WT/WT	c.820G>A/ WT
rs2235373	<i>Intron 7</i>	c.1060+37G> A	-	Sem significado clínico	c.1060+37 G>A/WT	c.1060+3 7G>A /WT	WT/WT

WT: *wildtype* (sequência selvagem). Bases de dados utilizadas para pesquisa das variantes: *ClinVar Database, dbSNP, 1000 Genomes Project, AbraOm e HGMD.*

No trio foi realizado o sequenciamento completo com resultado satisfatório em todos os *exons*. Não foram observadas variantes nos *exons* 1, 3, 4, 8 e 9 do caso índice, nos *exons* 1,2, 3, 4, 8 e 9 do pai, e nos *exons* 3, 4, 8 e 9 da mãe.

As variantes já descritas na literatura: c.459G>T, c.1060+37G>A, c.820G>A foram identificadas em heterozigose no caso índice; e a c.667+27C>G foi identificada em homozigose. A c.820G>A apresentou herança materna e as variantes c.1060+37G>A e c.459G>T de origem paterna. Enquanto a c.667+27C>G apresentou herdabilidade pelo lado materno e paterno. As variantes c.-338A>T, c.-313T>A e c.-75-4A>G foram observadas em heterozigose apenas na genitora. Todas estas foram classificadas como benignas, com exceção da c.1060+37G>A que não possui significado clínico.

A nova variante *missense* p.Phe266Ser foi identificada em heterozigose (TTT/TCT) no *exon 7* do gene *IRF6* da criança (Figura 3A) e sua segregação não foi confirmada nos genitores sendo portanto classificada como variante *de novo*. Esta variante não está registrada nas bases de dados *HGMD* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), *AbraOm* ([ABraOM: Brazilian genomic variants \(usp.br\)](http://www.abraom.org.br)), *1000 Genomes Project* (<http://www.internationalgenome.org/>), *Genome Aggregation Database* (gnomAD) (<http://gnomad.broadinstitute.org/>), *dbSNP* ([Home - SNP - NCBI \(nih.gov\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/)) e *ClinVar Database* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

A análise preditiva de patogenicidade da variante nova p.Phe266Ser foi realizada utilizando algoritmos dos programas *PROVEAN* (<http://provean.jcvi.org/index.php>); *SIFT* (*Sorting Intolerant From Tolerant*) (<http://sift-dna.org>); *PolyPhen-2* (*Polymorphism Phenotyping*) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>); *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org/>); *Align GVGD* (<http://agvgd.hci.utah.edu/>); *MutPred-2* (<http://mutpred.mutdb.org>). Todos os resultados foram congruentes quanto ao seu efeito deletério (Quadro 2).

A análise de conservação do aminoácido alterados na proteína IRF6 humana foi realizada utilizando o programa *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), com informações obtidas no banco de sequências *UniProt* (<http://www.uniprot.org>).

Quadro 2- Parâmetros para classificação da patogenicidade da variante nova conforme programas preditivos utilizados.

Programas	p.Phe266Ser	Classificação/Score	
	Resultado	Deletéria	Neutra
<i>PROVEAN</i>	-4.324	<-2.5	>-2.5
<i>SIFT</i>	0,01	<0,05	>0,05
<i>PolyPhen-2</i>	1.0	1.0	0.0
<i>Mutation Taster</i>	155	215	0.0
<i>Align GVG D</i>	C65	C65	C0
<i>MutPred2</i>	0.582	1.0	0.0

Quadro 3- Parte da proteína IRF6 gerada pelo programa *Clustal Omega*. O aminoácido destacado em vermelho é a fenilalanina na posição 266.

Espécies	Código UniProtKB	Tamanho proteína	Sequência de aminoácidos
<i>Homo sapiens</i>	O14896	467	PMPDQEEL F GPVSLLEQVKF
<i>Pan troglodytes</i>	A0A2I3TSL3	467	PMPDQEEL F GPVSLLEQVKF
<i>Macaca mulatta</i>	F7HP73	467	PMPDQEEL F GPVSLLEQVKF
<i>Equus ferus caballus</i>	A0A3Q2HQB9	467	PMPDQEEL F GPVSLLEQVKF
<i>Felis silvestris catus</i>	M3WM06	480	PMPDQEEL F GPVSLLEQVKF
<i>Bos taurus</i>	Q08DD6	467	PMPDQEEL F GPVSLLEQVKF
<i>Sus scrofa</i>	E9LK28	467	PMPDQEEL F GPVSLLEQVKF
<i>Mus musculus</i>	P97431	467	PMPDQEEL F GPVSLLEQVKF
<i>Rattus norvegicus</i>	D4AAV0	467	PMPDQEEL F GPVSLLEQVKF
Homologia	-	-	*****

*refere-se à concordância de homologia entre as sequências.

A pontuação de patogenicidade decorrente da análise preditiva e de conservação dos programas citados previu que a alteração p.Phe266Ser é causativa para o fenótipo de SVW nesta paciente.

Para compreender os impactos moleculares causados pela variante p.Phe266Ser na proteína IRF6, foram utilizados os programas de modelagem *Swiss-model*

(swissmodel.expasy.org) e *PyMOL* (<https://www.pymol.org>). O modelo utilizado foi da proteína IRF5 (código de acesso: 3DSH_A). O resíduo Phe58 da IRF5 foi escolhido por apresentar 100% de identidade com o resíduo Phe266 da IRF6 (Figura 3B).

As estruturas moleculares dos aminoácidos fenilalanina e serina estão apresentadas na Figura 3C. A substituição da Phe58 por Ser58 modifica as interações bioquímicas periféricas a 4 angstrom (Å) no interior da proteína e cria uma ligação de hidrogênio com a Gln54. As interações com os aminoácidos Arg42, Ala50, Leu57, Gly59, Gln54 e Val55 foram mantidas, foi estabelecida uma nova interação com a Thr51, e as interações com os aminoácidos Arg92, Val224, Asp91, Leu48, Glu49 foram perdidas (Figura 3D).

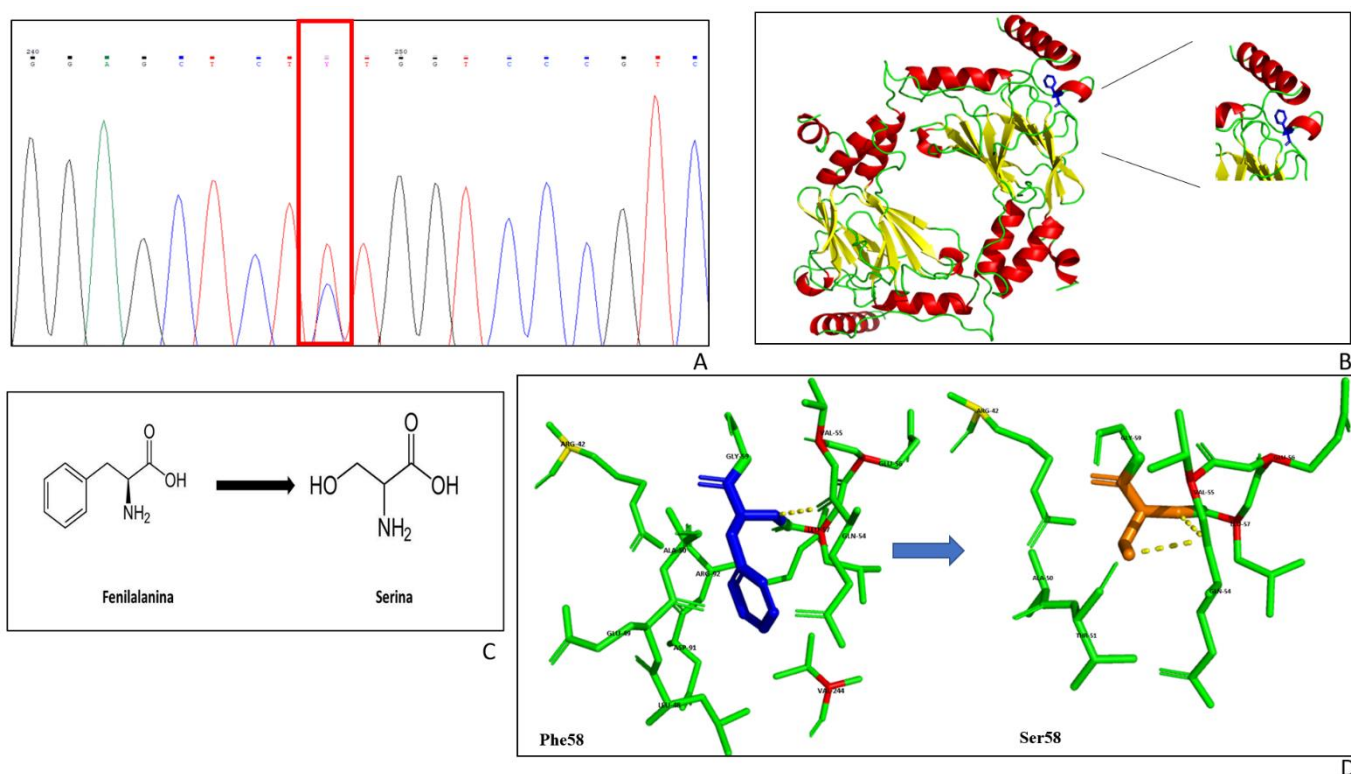


Figura 2- A– Parte de um eletroferograma gerado pelo programa Chromas, indicando a heteroziguidade (T/C). G (preto) = guanina; C (azul) = citosina; T (vermelha) = timina; A (verde) = adenina. B- Modelagem do resíduo IRF5 utilizado como modelo homólogo. Regiões destacadas em verde= alças de ligação; vermelho= alfa-hélice; amarelo= folhas-beta. Em destaque o alelo selvagem Phe58 (em azul). C- Ilustração das estruturas químicas dos aminoácidos fenilalanina e serina. Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (2022). D– Substituição de uma fenilalanina (destaque em azul) por uma serina (destaque em laranja) e suas respectivas interações. As linhas pontilhadas em amarelo representam as ligações de hidrogênio com o resíduo Gln54. Em verde= alças de ligação; vermelho= alfa-hélice.

Discussão

Embora o gene *IRF6* seja bem estudado, suas funções durante a embriogênese e vida pós-natal ainda não são completamente compreendidas. Como outros interferons, o *IRF6* tem importante função na regulação da resposta imune, mas estudos de expressão indicam que este é o único com função na diferenciação de células ectodérmicas e no desenvolvimento craniofacial, com participação em diferentes vias de sinalização com outros genes associados à diferenciação da epiderme e do próprio desenvolvimento da face. Além disso, estudos sugerem uma possível atuação como gene supressor tumoral (ALADE et al., 2020; METWALLI et al., 2018; STARINK et al., 2017).

O gene *IRF6* (ENST00000117595) é composto por 9 *exons* sendo que os *exons* 1, 2 e a região terminal do *exon* 9 não são codificantes, mas importantes para o reconhecimento dos mecanismos genéticos que participam na codificação da proteína (ENSEMBL, 2022; FERREIRA DE LIMA et al., 2009).

A proteína IRF6 contém 467 aminoácidos (ENST00000367021.8), possui um domínio N-terminal de ligação ao DNA altamente conservado, região codificada pelos *exons* 3 e 4, e um domínio C-terminal de ligação a proteínas menos conservado, codificado pelos *exons* 7, 8 e 9. (BEZERRA et al., 2020; DESMYTER et al., 2010; OMIM, 2022).

De fato, a proteína IRF6 (ENST00000367021.8) é uma provável ativadora transcricional de ligação ao DNA. Tem papel determinante no desenvolvimento da epiderme, controlando a proliferação-diferenciação de queratinócitos e regulando a proliferação epitelial mamária. Sua deficiência leva a malformações de estruturas craniofaciais e de membros, anormalidades de pele, dentárias, das glândulas salivares e de outras glândulas exócrinas (ALADE et al., 2020; BEZERRA et al., 2020; DESMYTER et al., 2010; STRING, 2022), estruturas essas derivadas do ectoderma.

Embora tenham sido descritos diversos tipos de variantes, as que causam haploinsuficiência e resultam em truncamento da proteína são as mais frequentes (PEYRARD-JANVID et al., 2014).

Em 70% dos casos, a SVW é causada por variantes nos *exons* 3 e 4 ou nos *exons* 7, 8 e 9, com maior concentração no *exon* 4, sugerindo que este *exon* poderia ter uma função principal dentro do domínio de ligação ao DNA (FERREIRA DE LIMA et al., 2009). Contudo, mais recentemente, estudos funcionais com embriões de *zebrafish* revelaram que apenas 15 entre 30 variantes *missense* se mostraram patogênicas. Dentre

as 15, 11 destas estavam localizadas nos *exons* 7 a 9 (LESLIE et al, 2013; LESLIE 2016; ALADE et al., 2020).

No presente caso a variante p.Phe266Ser também foi identificada no *exon* 7 do gene *IRF6*, o que reforça que este seja um *hot spot* de variantes *missense* relacionadas ao fenótipo da SVW. Como esta substituição não foi encontrada nas bases de dados consultadas e tampouco está presente nos genitores, foi classificada como variante nova *de novo*.

De acordo com o *American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology* (ACMG/AMP) as variantes detectadas em distúrbios que seguem padrão de herança mendeliano devem ser classificadas em “patogênica”, “provavelmente patogênica”, “significado incerto”, “provavelmente benigna” e “benigna”, considerando critérios de dados populacionais, computacionais, funcionais e de segregação.

Nos casos de variantes *missense*, também é importante avaliar se a substituição ocorreu em regiões conservadas evolutivamente entre espécies e qual a consequência bioquímica decorrente da troca do nucleotídeo e do aminoácido pois poderá alterar a estrutura terciária da proteína. Caso a variante ocorra em região conservada, espera-se danos mais graves à proteína (BETTS; RUSSELL, 2003). Estas inferências são reforçadas com as análises de predição *in silico* e de modelagem (RICHARDS et al., 2015).

A variante p.Phe266Ser foi classificada como patogênica segundo os programas de predição *PROVEAN*, *SIFT*, *PolyPhen-2*, *Mutation Taster*, *Align GVGD* e *MutPred-2* recomendados pelo ACMG/AMP (RICHARDS et al., 2015). Chama-se a atenção para os resultados obtidos nos programas *PolyPhen-2* e *Align GVGD*, nos quais a variante alcançou o *score* máximo de patogenicidade (Quadro 2).

A p.Phe266Ser está localizada em uma região altamente conservada entre as espécies de mamíferos analisadas. Nestes casos, Betts e Russel (2003) apontam que há risco de danos mais graves à proteína *IRF6* (Quadro 3). Quanto às características bioquímicas dos aminoácidos envolvidos, tem-se a fenilalanina como um aminoácido aromático altamente hidrofóbico que proporciona maior estabilidade à molécula por causa do compartilhamento uniforme de elétrons entre os átomos e baixa interação com

outras moléculas. Por outro lado, a serina é altamente hidrofílica e possui em sua cadeia lateral um grupo hidroxila (OH) (Figura 3C) bastante reativo com potencial de realizar interações com outras moléculas o que pode diminuir a flexibilidade da região (BETTS; RUSSELL, 2003).

A proteína IRF5, utilizada como modelo homólogo à região de interesse da proteína IRF6, possui 14 alfa-hélices, 20 folhas-beta e 33 alças de ligação. A Phe58, resíduo correspondente a Phe266 na proteína IRF6, encontra-se no interior da proteína, que juntamente com os aminoácidos Glu56, Val55 e Leu57 compõem a segunda alfa hélice (<https://www.pymol.org>).

De acordo com a análise de modelagem realizada no *PyMOL*, a nova variante p.Phe266Ser causou uma alteração estrutural na segunda alfa-hélice da proteína, estabelecendo uma nova ponte de hidrogênio com o aminoácido Gln54. Isto ocorreu devido à presença do grupo hidroxila (OH), altamente reativo, proveniente do aminoácido serina.

Infere-se, portanto, que a substituição do aminoácido fenilalanina por serina resultou em modificações na polaridade da proteína IRF6 e interação com outras moléculas por promover o estabelecimento de novas ligações e a perda de interações com aminoácidos periféricos.

Considerando os resultados das análises preditivas *in silico*, de conservação entre espécies e de impacto bioquímico da substituição p.Phe266Ser, infere-se que esta variante ocasiona mudanças prejudiciais na proteína IRF6 e, portanto, correlaciona-se com fenótipo de SVW na criança. A ausência da variante nos genitores fenotipicamente normais, reforça a hipótese. Assim, a variante *de novo* p.Phe266Ser foi classificada como patogênica.

A extensa variabilidade fenotípica, a penetrância incompleta e a heterogeneidade genética dificultam o diagnóstico, o estabelecimento de correlações genótipo-fenótipo e o aconselhamento genético na SVW. A descrição desta variante e a análise de seus efeitos contribuem para superar as lacunas do conhecimento que persistem nessa área.

REFERÊNCIAS

ALADE, A. A. et al. Non-random distribution of deleterious mutations in the DNA and protein-binding domains of IRF6 are associated with Van Der Woude syndrome. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 8, n. 8, 2020.

BETTS, M.; RUSSELL, R. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. **Bioinformatics for Geneticists**, p. 289–316, 2003.

BEZERRA, J. F. et al. IRF6 polymorphisms in Brazilian patients with non-syndromic cleft lip with or without palate. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 86, n. 6, p. 696–702, 11 dez. 2020.

BURDICK, A. B. Genetic epidemiology and control of genetic expression in van der Woude syndrome. **Journal of craniofacial genetics and developmental biology. Supplement**, v. 2, p. 99–105, 1986.

DESMYTER, L. et al. IRF6 Screening of Syndromic and a priori Non-Syndromic Cleft Lip and Palate Patients: Identification of a New Type of Minor VWS Sign. **Molecular syndromology**, v. 1, n. 2, p. 67–74, 2010.

ENSEMBL. **Gene: IRF6.** Disponível em: <https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000117595;r=1:209785617-209806175>. Acesso em: 22 fev. 2022.

FERREIRA DE LIMA, R. L. L. et al. Prevalence and nonrandom distribution of exonic mutations in interferon regulatory factor 6 in 307 families with Van der Woude syndrome and 37 families with popliteal pterygium syndrome. **Genetics in Medicine**, v. 11, n. 4, p. 241–247, 2009.

LESLIE, E. J. et al. Comparative analysis of IRF6 variants in families with Van der Woude syndrome and popliteal pterygium syndrome using public whole-exome databases. **Genetics in Medicine**, v. 15, n. 5, p. 338–344, maio 2013.

LESLIE, E. J. et al. A Genome-wide Association Study of Nonsyndromic Cleft Palate Identifies an Etiologic Missense Variant in GRHL3. **The American Journal of Human Genetics**, v. 98, n. 4, p. 744–754, abr. 2016.

METWALLI, K. A. et al. Interferon Regulatory Factor 6 Is Necessary for Salivary Glands and Pancreas Development. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 2, p. 226–236, 1 fev. 2018.

OMIM. **Cleft Orofacial.** Disponível em: <https://www.omim.org/search?index=entry&start=1&limit=10&sort=score+desc%2C+prefix_sort+desc&search=cleft+orofacial+>. Acesso em: 22 fev. 2022.

PEYRARD-JANVID, M. et al. Dominant mutations in GRHL3 cause Van der Woude Syndrome and disrupt oral periderm development. **American journal of human genetics**, v. 94, n. 1, p. 23–32, 2 jan. 2014.

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–424, 8 maio 2015.

SCHUTTE, C. B. et al. **GeneReviews**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1407/>>. Acesso em: 23 fev. 2022.

STARINK, E. et al. Genetic analysis of IRF6, a gene involved in craniofacial midline formation, in relation to pituitary and facial morphology of patients with idiopathic growth hormone deficiency. **Pituitary**, v. 20, n. 5, p. 499, 1 out. 2017.

STRING. **IRF6**. Disponível em: <<https://string-db.org/cgi/network?taskId=b3k21ZEY1WHR&sessionId=biGCc1znrSBr>>. Acesso em: 22 fev. 2022.

VELÁZQUEZ-ARAGÓN, J. A. et al. Screening of IRF6 Variants in Patients Subjected to Genetic Association Studies for Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. **The Cleft Palate-Craniofacial Journal**, v. 58, n. 9, p. 1128–1134, 17 set. 2021.

7. CONCLUSÕES

- Os dados epidemiológicos são concordantes com o descrito na literatura;
- A alta frequência de casos familiares de FOTNS é um achado peculiar deste trabalho, apresentando quase o dobro do descrito em literatura;
- Até o momento não foi observada nenhuma variante patogênica do gene *IRF6* nos casos familiares de FOTNS, mesmo naqueles com transmissão genitor(a)-filho(a);
- A variante nova p.Phe266Ser, *de novo*, foi classificada como causativa no único caso de SVW desta casuística.

8. LIMITAÇÕES

Houve importante impacto sobre o tamanho da casuística elegível para análise molecular, uma vez que dos 97 casos familiares de FOTNS, foi possível investigar 29 indivíduos.

Outra limitação importante foi a não conclusão do sequenciamento de todos os *exons* do *IRF6* nos casos familiares. A obtenção destes resultados poderá alterar o atual panorama molecular desta casuística.

REFERÊNCIAS

- ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature methods**, v. 7, n. 4, p. 248–249, abr. 2010.
- ALLAM, K. A.; HAREDY, M. M. Clinical Findings and Outcomes of Palatal Repair in 9 Patients with Van der Woude Syndrome. **Annals of Plastic Surgery**, v. 87, n. 2, p. 165–168, 1 ago. 2021.
- BEATY, T. H.; MARAZITA, M. L.; LESLIE, E. J. Genetic factors influencing risk to orofacial clefts: Today's challenges and tomorrow's opportunities. **F1000Research**, v. 5, 2016.
- BEZERRA, J. F. et al. IRF6 polymorphisms in Brazilian patients with non-syndromic cleft lip with or without palate. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 86, n. 6, p. 696–702, 11 dez. 2020.
- BRASIL, M. DA S. S. DE V. EM S. **Anomalias congênitas no Brasil, 2010 a 2019: análise de um grupo prioritário para a vigilância ao nascimento**. Disponível em: <moz-extension://3ec0c39d-f009-4f45-86cf-e3355b71e918/enhanced-reader.html?openApp&pdf=http%3A%2F%2Fplataforma.saude.gov.br%2Fanomalias-congenitas%2Fboletim-epidemiologico-SVS-06-2021.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2022.
- BURDICK, A. B. Genetic epidemiology and control of genetic expression in van der Woude syndrome. **Journal of craniofacial genetics and developmental biology. Supplement**, v. 2, p. 99–105, 1986.
- BUTALI, A. et al. Folic Acid Supplementation Use and the MTHFR C677T Polymorphism in Orofacial Clefts Etiology: An Individual Participant Data Pooled-Analysis. **Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology**, v. 97, n. 8, p. 509–514, ago. 2013.
- CHOI, Y.; CHAN, A. P. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 31, n. 16, p. 2745–2747, 19 jan. 2015.
- 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, n. 3, p. 241–245, 1 abr. 2016.
- DE-ARAÚJO, M. et al. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 29, n. 1, p. 1–13, jan. 1996.
- DESMYTER, L. et al. IRF6 Screening of Syndromic and a priori Non-Syndromic Cleft Lip and Palate Patients: Identification of a New Type of Minor VWS Sign. **Molecular syndromology**, v. 1, n. 2, p. 67–74, 2010.
- DIXON, M. J. et al. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, n. 3, p. 167–178, mar. 2011.

FABBRI, G. et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 11, p. 2273–2288, 21 out. 2013.

FÉLIX, T. M. et al. Epidemiology of rare diseases in Brazil: protocol of the Brazilian Rare Diseases Network (RARAS-BRDN). **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 17, n. 1, p. 84, 24 dez. 2022.

FERREIRA DE LIMA, R. L. L. et al. Prevalence and nonrandom distribution of exonic mutations in interferon regulatory factor 6 in 307 families with Van der Woude syndrome and 37 families with popliteal pterygium syndrome. **Genetics in Medicine**, v. 11, n. 4, p. 241–247, 2009.

FONTES, M. I. B. et al. Local strategies to address health needs of individuals with orofacial clefts in alagoas, Brazil. **The Cleft palate-craniofacial journal: official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association**, v. 50, n. 4, p. 424–431, jul. 2013.

GIL-DA-SILVA-LOPES, V. L. et al. Brazil's Craniofacial Project: Different approaches on orofacial clefts and 22q11.2 deletion syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 184, n. 4, p. 912–927, 9 dez. 2020.

GOWANS, L. J. J. et al. The prevalence, penetrance, and expressivity of etiologic IRF6 variants in orofacial clefts patients from sub-Saharan Africa. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 5, n. 2, p. 164–171, 1 mar. 2017.

GUNDLACH, K. K. H.; MAUS, C. Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world-wide. **Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 34 Suppl 2, n. SUPPL. 2, p. 1–2, set. 2006.

LESLIE, E. J. et al. Comparative analysis of IRF6 variants in families with Van der Woude syndrome and popliteal pterygium syndrome using public whole-exome databases. **Genetics in Medicine**, v. 15, n. 5, p. 338–344, maio 2013.

LESLIE, E. J. et al. IRF6 mutation screening in non-syndromic orofacial clefting: analysis of 1521 families. **Clinical genetics**, v. 90, n. 1, p. 28–34, 1 jul. 2016.

LESLIE, E. J.; MARAZITA, M. L. Genetics of cleft lip and cleft palate. **American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics**, v. 163C, n. 4, p. 246–258, nov. 2013.

MACHADO, RENATO. A. et al. **Potential genetic markers for nonsyndromic oral clefts in the Brazilian population: A systematic review and meta-analysis.** **Birth Defects Research** John Wiley and Sons Inc., , 1 jun. 2018.

MARTINELLI, M. et al. Non-syndromic Cleft Palate: An Overview on Human Genetic and Environmental Risk Factors. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 20 out. 2020.

MASTROIACOVO, P. et al. Prevalence at birth of cleft lip with or without cleft palate: data from the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTC). **The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association**, v. 48, n. 1, p. 66–81, jan. 2011.

MATHE, E. et al. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 5, p. 1317, 2006.

METWALLI, K. A. et al. Interferon Regulatory Factor 6 Is Necessary for Salivary Glands and Pancreas Development. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 2, p. 226–236, 1 fev. 2018.

MONLLEÓ, I. et al. Fendas Orais no Sistema Único de Saúde – Alagoas: Definição de modelo para referência e contrarreferência em genética. **Com. Ciências Saúde**, v. 28, p. 23–30, 2017.

MONLLEÓ, I. L. et al. Implementing the Brazilian Database on Orofacial Clefts. **Plastic Surgery International**, v. 2013, p. 1–10, 12 mar. 2013.

MOSSEY, P. A. et al. Cleft lip and palate. **Lancet (London, England)**, v. 374, n. 9703, p. 1773–1785, 2009.

MOSSEY, P. A.; MODELL, B. Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. **Frontiers of oral biology**, v. 16, p. 1–18, 27 jun. 2012.

NOPOULOS, P. et al. Abnormal brain structure in adults with Van der Woude syndrome. **Clinical Genetics**, v. 71, n. 6, p. 511–517, 10 maio 2007.

OMIM. **Cleft Orofacial**. Disponível em: <https://www.omim.org/search?index=entry&start=1&limit=10&sort=score+desc%2C+prefix_sort+desc&search=cleft+orofacial+>. Acesso em: 22 fev. 2022.

PEJAVER, V. et al. Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. **Nature Communications** 2020 **11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 20 nov. 2020.

PEYRARD-JANVID, M. et al. Dominant mutations in GRHL3 cause Van der Woude Syndrome and disrupt oral periderm development. **American journal of human genetics**, v. 94, n. 1, p. 23–32, 2 jan. 2014.

RIZOS, M.; SPYROPOULOS, M. N. Van der Woude syndrome: a review. Cardinal signs, epidemiology, associated features, differential diagnosis, expressivity, genetic counselling and treatment. **The European Journal of Orthodontics**, v. 26, n. 1, p. 17–24, 1 fev. 2004.

SABBAGH, H. J. et al. Parental Consanguinity and Nonsyndromic Orofacial Clefts in Children: A Systematic Review and Meta-Analyses. **The Cleft Palate-Craniofacial Journal**, v. 51, n. 5, p. 501–513, 1 set. 2014.

SALEEM, K. et al. **Assessment of candidate genes and genetic heterogeneity in human non syndromic orofacial clefts specifically non syndromic cleft lip with or without palate.** *Heliyon* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2019.

SCHWARZ, J. M. et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature methods*, v. 11, n. 4, p. 361–362, 2014.

SILVA, C. M. et al. Can parental consanguinity be a risk factor for the occurrence of nonsyndromic oral cleft? *Early Human Development*, v. 135, p. 23–26, ago. 2019.

SIM, N. L. et al. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic acids research*, v. 40, n. Web Server issue, jul. 2012.

SPINA, V. A proposed modification for the classification of cleft lip and cleft palate. *The Cleft palate journal*, v. 10, p. 251–2, jul. 1973.

TAVTIGIAN, S. V. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *Journal of Medical Genetics*, v. 43, n. 4, p. 295–305, 9 set. 2005.

TOLAROVÁ, M.; CERVENKA, J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *American journal of medical Genetics*, v. 75, p. 126–137, 1998.

URAL, A. et al. Van der Woude Syndrome With a Novel Mutation in the IRF6 Gene. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 30, n. 5, p. e465–e467, 2019.

VELÁZQUEZ-ARAGÓN, J. A. et al. Screening of IRF6 Variants in Patients Subjected to Genetic Association Studies for Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, v. 58, n. 9, p. 1128–1134, 17 set. 2021.

VIEIRA, A. R. et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America. *American journal of medical genetics. Part A*, v. 143A, n. 17, p. 2075–2078, 1 set. 2007.

VOIGT, A. et al. [Cleft lip and palate]. *Der Pathologe*, v. 38, n. 4, p. 241–247, jul. 2017.

VOLPE-AQUINO, R. M. et al. CranFlow: An Application for Record-Taking and Management Through the Brazilian Database on Craniofacial Anomalies. *Birth Defects Research*, v. 110, n. 1, p. 72–80, 15 jan. 2018.

WANG, M. et al. Prevalence of oral clefts among live births in Gansu Province, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies: report of WHO meetings on International Collaborative Research on Craniofacial Anomalies.** [s.l.] Human Genetics Programme, Management of Noncommunicable Diseases, World Health Organization, 2001.

YOUNG, J.; SLIFER, S. DNA methylation variation is identified in monozygotic twins discordant for non-syndromic cleft lip and palate. **Frontiers in Cell and Developmental Biology** , v. 9, 2021.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais

Pesquisador: Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 4

CAAE: 85020018.8.3015.5013

Instituição Proponente: Universidade Federal de Alagoas

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE ALAGOAS
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.099.363

Apresentação do Projeto:

A este projeto visa reconhecer características da população brasileira com anomalias craniofaciais (ACF) por meio da coleta padronizada de informações sociodemográficas, clínicas e genéticas de indivíduos com ACF. Este será desenvolvido por meio de entrevista com pais (ou responsáveis) ou o próprio indivíduo com ACF (pessoalmente ou por telefone), realização de exames subsidiários e testes genéticos para esclarecimento diagnóstico individual, comparação entre resultados de exames anônimos para definição de características etiológicas populacionais, registro do seguimento clínico padronizado, armazenamento de fotos, gravações de áudio e vídeos para o reconhecimento da história natural das diferentes condições clínicas com ACF. O instrumento de coleta de dados on line (CranFlow) foi desenvolvido e implantado anteriormente por este grupo de pesquisa; as informações são armazenadas em ambiente digital seguro. Haverá armazenamento de amostras em biorrepositório regulamentado já existente. Como benefício individual, este projeto poderá realizar testes genéticos ainda não disponíveis no serviço em que o paciente é atendido, esclarecer o diagnóstico e permitir aconselhamento genético. Como benefício coletivo, a caracterização de fatores de risco populacionais para ACF específicas, o reconhecimento

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n - Campus A . C. Simões,
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 57.072-900
UF: AL **Município:** MACEIO
Telefone: (82)3214-1041 **E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

ANEXO B – Termo de Compromisso Livre Esclarecido



EBSERH
HOSPITAIS UNIVERSITÁRIOS FEDERAIS

MINISTÉRIO DA
EDUCAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. ALBERTO ANTUNES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Base de Dados Brasileira de Anomalias Craniofaciais

Coordenadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Local de execução: Serviço de Genética Clínica, Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes, Universidade Federal de Alagoas (SGC-HUPAA/UFAL)

Responsável Local: Profa Dra Isabella Lopes Monlleó

Número CAAE: 85020018.8.3015.5013

Nome do participante: _____

Você (ou a pessoa pela qual é responsável) está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

As anomalias craniofaciais são alterações na cabeça (crânio) ou no rosto (face) que já nascem com a pessoa (congênitas). Elas são de vários tipos e podem aparecer sozinhas ou junto com outras anomalias congênitas, também na mesma região ou em outras partes do corpo. Sabe-se que genética e ambiente influenciam no aparecimento das anomalias craniofaciais, mas não se conhecem todas as causas e maneiras como isso acontece. O motivo de realizar esta pesquisa é aumentar o conhecimento sobre essas causas para contribuir com a melhoria dos cuidados de saúde e com a prevenção de novos casos nas famílias e na população. Para tanto, é necessário reunir informações médicas e realizar testes genéticos nas pessoas que apresentam anomalias craniofaciais e em seus familiares. Os objetivos desta pesquisa são: registrar informações socioeconômicas, médicas, familiares e genéticas de pessoas afetadas, na Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais, buscar causas e desenvolver propostas de educação para cuidados de saúde e prevenção de anomalias craniofaciais.

Procedimentos: Faz parte desta pesquisa: (1) Coleta de informações socioeconômicas, médicas e familiares em consultas realizadas no ambulatório de genética craniofacial do Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Prof Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (SGC/HUPAA/UFAL). Estas poderão ser complementadas, caso necessário, por entrevista telefônica e fotografias que serão guardadas na Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais (BBAC) em ambiente digital seguro. (2) Gravação de áudio e (ou) vídeo, quando necessário, que ficarão guardados com o pesquisador no local onde o atendimento foi realizado. Estas são realizadas rotineiramente para acompanhamento de tratamento de anomalias craniofaciais e são parte de prontuário médico, não sendo descartadas. De acordo com cada caso, é possível que esta documentação (ou parte dela) venha a ser anexado à BBAC, com o objetivo de registrar características específicas da história natural do quadro clínico. (3) Coleta de material biológico sendo sangue – de 04 a 08

Av. Lourival Melo Mota, SN
Cidade Universitária
CEP: 57072-900 | Maceió-AL
Telefone: (82) 3202 3800

Rubricas:

Página 1 de 4

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. ALBERTO ANTUNES

ml, saliva, urina e tecido (pele, mucosa, músculos), este último resultante de cirurgia do participante e outros membros da família (pai, mãe e – quando for o caso – outros familiares com problemas semelhantes ao do participante). Essas amostras poderão ser utilizadas em diversos exames genéticos. Cada procedimento será realizado de acordo com a necessidade de cada participante.

Desconfortos e riscos:

A participação nesse estudo pode gerar os seguintes desconfortos: (1) cansaço devido à duração da consulta para preenchimento da Base Brasileira de Anomalias Craniofaciais que é de 40 a 50 minutos e (2) timidez, vergonha ou estranheza para fornecer informações e realizar fotografias gravar áudio e (ou) vídeo. Para minimizar estes desconfortos, serão tomadas medidas para que os procedimentos sejam realizados da maneira mais ágil possível, em ambiente reservado. (3) Dor durante a coleta de sangue periférico e formação de manchas roxas na região onde foi introduzida a agulha. Será garantida coleta por profissional habilitado. (4) A obtenção de outros tecidos será vinculada ao procedimento cirúrgico de acordo com o plano de tratamento do participante estabelecido pelo cirurgião assistente. Os desconfortos e riscos são relacionados ao tratamento cirúrgico e independem da utilização desse pedaço de pele em pesquisa. Não há risco previsível adicional relacionado ao procedimento cirúrgico. Não há outros riscos previsíveis.

Benefícios:

O benefício direto para o participante e sua família poderá incluir a realização de testes que ainda não estão disponíveis no SGC/HUPAA/UFAL e que podem esclarecer o diagnóstico, a oportunidade de um planejamento do tratamento baseado no diagnóstico e, também, aconselhamento genético, quando for o desejo da família.

Acompanhamento de saúde e aconselhamento genético:

A Dra Isabella Lopes Monlleó e o Dr Marshall Italo Barros Fontes, ambos médicos geneticistas do SGC/HUPAA/UFAL, realizarão o acompanhamento do participante e sua família, informarão os resultados dos exames genéticos e realizarão o aconselhamento genético, quando pertinente e de forma gratuita. Os dados genéticos são confidenciais e não serão repassados a terceiros como seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, entre outros. Os mecanismos de proteção dos dados genéticos incluem: 1) BBAC com sistema fechado ao público; 2) Acesso dos responsáveis pelo participante da pesquisa por meio de senha; 3) Registro na BBAC com mecanismo eletrônico padrão de não identificação dos dados inseridos, inclusive fotos e gravações; 4) amostras biológicas registradas em laboratório por meio de número não diretamente relacionado ao nome do participante (apenas os responsáveis pelo participante terão acesso à identificação). O participante da pesquisa ou seus responsáveis têm o direito de retirar dados de qualquer natureza a qualquer momento, tanto da BBAC quanto amostras biológicas armazenadas. Entretanto, nesta situação, os médicos geneticistas Dra Isabella Lopes Monlleó e Dr Marshall Italo Barros Fontes poderão não ter condições de concluir o diagnóstico ou realizar o aconselhamento genético.

Sigilo e privacidade:

O participante tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Poderá ser necessário usar fotografias, áudios e vídeos do participante em reuniões e (ou) publicações científicas. O nome do participante ou qualquer dado de identificação (filiação, local de atendimento, ou outras informações que permitam a identificação) não serão citados na divulgação dos resultados da pesquisa. Entretanto, tratando-se de anomalia craniofacial rara, pode existir a necessidade de divulgação da descrição ou exibição de foto sem cobertura da face. Isto ocorrerá

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. ALBERTO ANTUNES

com o objetivo de esclarecer a comunidade científica sobre determinado aspecto da anomalia craniofacial, facilitando o diagnóstico, acompanhamento clínico e tratamento de casos semelhantes.

Ressarcimento e Indenização:

Esta pesquisa não prevê ressarcimento de despesas, pois todos os procedimentos serão realizados no mesmo dia, período e local de consultas do SGC/HUPAA/UFAL. Quando ocorrer a necessidade de comparecimento fora da rotina, relacionado exclusivamente a este projeto e por solicitação do responsável pelo projeto, as despesas de transporte e alimentação serão ressarcidas. O participante terá direito à indenização em caso de danos decorrentes do estudo.

Utilização do material biológico colhido:

As amostras terão os seguintes destinos conforme necessidade diagnóstica do indivíduo e sua família: (1) Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas para realização de exame de cariótipo, (2) Laboratório de Genética Molecular Humana do SGC/HUPAA/UFAL para realização de testes diagnósticos por meio de técnicas de biologia molecular, (3) Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, instituição coordenadora desta pesquisa, para realização de testes diagnósticos com técnicas de citogenética molecular e citogenômica não disponíveis na UFAL e (4) para outros laboratórios no Brasil para realização de exames diagnósticos relacionados aos objetivos desta pesquisa, não disponíveis na UFAL e na UNICAMP. É possível que, em benefício do participante desta pesquisa, havendo oportunidade de investigação laboratorial diagnóstica de doença rara em outro país, uma amostra biológica seja enviada com este fim. Não há como prever quem ou que exames serão necessários, por isso quando surgir e se surgir essa necessidade, os responsáveis pela pesquisa solicitarão apreciação ética e apenas remeterão a amostra após autorização. O resultado do exame será informado ao participante e (ou) seus responsáveis.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com Profa. Dra. Isabella Lopes Monlleó pelo telefone (82) 3202-3896 ou dirigir-se ao HUPAA/UFAL, localizado na Avenida Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, Maceió-AL. Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL, pelo telefone: 3214-1041, e-mail-comitedeeticaufal@gmail.com ou pessoalmente no endereço Avenida Lourival Melo Mota, prédio da Reitoria, Maceió-AL.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar. Estou ciente de que devo manter meu endereço e telefones de contato sempre atualizados junto ao responsável pela pesquisa e declaro ter recebido uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas.

Nome: _____ Data: ____/____/____.

_____ (Assinatura do participante ou do seu responsável legal)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. ALBERTO ANTUNES

Guarda e utilização do material biológico em novas pesquisas:

Existe a possibilidade de guardar parte não utilizada das amostras biológicas em biorrepositório criado para este fim localizado no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Estas amostras poderão ser utilizadas em outras pesquisas tanto no Brasil como no exterior. Nestes casos, novos projetos de pesquisa deverão ter a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Em relação a este item, eu:

AUTORIZO o armazenamento do material biológico SENDO NECESSÁRIO meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

NÃO AUTORIZO o armazenamento do material biológico, DEVENDO o mesmo SER DESCARTADO ao final desta pesquisa.

Você pode retirar o consentimento da guarda e utilização do material biológico a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.

Disponibilização de informações em bases de dados científicas nacionais e (ou) mundiais: Como a maioria das anomalias craniofaciais são doenças raras, é importante comparar as características clínicas e genéticas de pessoas no Brasil e em outros países. Para isso, é necessário inserir informações médicas e resultados de testes genéticos em bases de dados públicas nacionais e (ou) mundiais. No compartilhamento dos dados é sempre assegurado que **NÃO** haverá qualquer identificação dos participantes, ou seja, não aparecerão informações como nome, sobrenome, filiação, endereço, número de registro hospitalar, cartão nacional de saúde ou qualquer outra que permita reconhecer o participante. Em relação a este item, eu:

AUTORIZO a disponibilização das informações médicas e resultados de testes genéticos em bases de dados públicas.

NÃO AUTORIZO a disponibilização das informações médicas e resultados de testes genéticos em bases de dados públicas.

Responsabilidade do Pesquisador: Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguo, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____.

ANEXO C – Termo de Assentimento Livre Esclarecido



Ministério da
Educação



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. ALBERTO ANTUNES

TERMO DE ASSENTIMENTO

Projeto: Base de Dados Brasileira de Anomalias Craniofaciais

Coordenadora: Profª. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Local de execução: Serviço de Genética Clínica, Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes, Universidade Federal de Alagoas (SGC-HUPAA/UFAL)

Responsável Local: Profª Dra Isabella Lopes Monlleó

Número CAAE: 85020018.8.3015.5013

Nome do participante: _____

O que é assentimento? É concordar em participar de uma pesquisa.

Que pesquisa? Juntar informações de pessoas parecidas com você e colocar no computador. Você participa se quiser.

O que acontece? Vamos perguntar sobre você, sua saúde, sua família, tirar fotos e gravar você e sua voz. Pode ser meio cansativo para seus pais responderem e parecer estranho filmar e fotografar você. Mas faremos o possível para não atrapalhar muito. Não contaremos a ninguém as respostas sobre você. As respostas ficarão guardadas em um computador. Vamos coletar sangue, cuspe e xixi e guardar em um freezer especial, para fazer exames. Vamos colher com muito cuidado, mas pode ficar roxo no local da picada da agulha. Se você for fazer alguma cirurgia no rosto, nós também pediremos um pedaço da pele que for retirada durante a operação para completar os seus exames. Inicialmente seus exames serão realizados aqui em Alagoas, mas se for necessário algum teste que nós não fazemos na UFAL, enviaremos uma parte do material que foi colhido (sangue, cuspe, xixi e pedaço de pele) para o laboratório da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) para completar seus exames. O que sobrar desse seu material, vai ficar guardado lá na Unicamp, em um local chamado biorrepositório. Nós poderemos enviar uma parte desse seu material para algum outro laboratório do Brasil ou do mundo que faça os exames que nós não temos desde que estes exames sejam importantes para descobrir seu diagnóstico. Se isso acontecer, antes de enviar o seu material, nós vamos pedir autorização ao comitê de ética da UFAL e ao comitê nacional.

Se participar, poderá descobrir o que causou a alteração na sua face, isso pode ajudar no seu tratamento. Desse modo, você também ajudará outras pessoas que são parecidas com você, porque poderemos comparar as respostas e os resultados dos exames de todos em diferentes lugares do mundo e conhecer melhor essa

Av. Lourival Melo Mota, SN
Cidade Universitária
CEP: 57072-900 | Maceió-AL
Telefone: (82) 3202 3800

Rubricas:

Página 1 de 2

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. ALBERTO ANTUNES

alteração. Tudo o que descobirmos na pesquisa contaremos a você e seus pais. Por isso, é importante sempre dizer para gente se mudar de endereço ou telefone.

Com quem converso sobre a pesquisa? A Dra Isabella Lopes Monlleó é quem cuida da pesquisa que você participa. Você pode falar com ela sempre que tiver dúvidas sobre a pesquisa, na consulta ou pelo telefone (82) 32023896, de segunda a sexta em horário comercial.

Qual é o endereço para escrever ao pesquisador? Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes da UFAL, Avenida Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, Maceió-AL CEP 57072-970.

No Comitê de Ética em Pesquisa tem pessoas que acompanham a pesquisa para ver se está sendo feita bem certinha. Você ou seus pais podem falar com eles pelo telefone 3214-1041, e-mail-comitedeeticaufal@gmail.com ou pessoalmente no endereço Avenida Lourival Melo Mota, prédio da Reitoria, Maceió-AL, de segunda a sexta em horário comercial.

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PARTICIPANTE

Eu li e entendi a pesquisa. Perguntei o que queria para o pesquisador. Entendi que posso dizer que não quero participar sem nenhum problema. E também que posso avisar se não quiser mais participar. Eu concordo com a pesquisa. Entendi que vou ter uma cópia deste papel.

[_____, ____ de _____ de ____]
Local data

Nome

Assinatura

Responsabilidade do Pesquisador:

Expliquei tudo e dei uma cópia para (nome do sujeito de pesquisa). Falei que esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética/CONEP. Vou fazer a pesquisa conforme informei neste documento e (nome do sujeito) aceitou participar.

Data: ____ / ____ / ____.

(Nome e assinatura do pesquisador)

ANEXO D – Formulário de primeira consulta de Fenda Orofacial

PROJETO CRÂNIO-FACE BRASIL
FORMULÁRIO DE PRIMEIRA CONSULTA
FENDA OROFACIAL



Código PCFB: _____ Número CNS: _____

A Informações gerais referentes ao paciente

1. Nome do paciente: _____
2. CPF do paciente: _____
3. Data do nascimento: _____
4. É filho adotivo?:
 Sim Não
5. Sexo legal:
 Masculino Feminino Não definido
6. Município e Estado de nascimento: _____
7. Escolaridade Paciente:
 Não Alfabetizado Ensino Médio Completo
 Alfabetizado Ensino Superior Incompleto
 Ensino Fundamental Incompleto Ensino Superior Completo
 Ensino Fundamental Completo Não se aplica
 Ensino Médio Incompleto Sem informação
8. Nome da Mãe: _____
9. Nome do Pai: _____
10. Renda Familiar: _____ em salários mínimos
11. Hospital: _____
12. Serviço: _____
13. Número de registro no Hospital ou Serviço: _____
14. Data da consulta: _____
15. Preenchido por: _____

B Contato com o paciente/família

16. Endereço completo: _____
17. Cidade e UF: _____
18. CEP: _____
19. Telefone Residencial: _____
20. Telefone Celular: _____
21. Telefone Comercial: _____
22. E-mail: _____

C Informações gerais referentes ao pai do paciente

23. Data de nascimento do pai do paciente: _____
24. Município e UF de nascimento do pai do paciente: _____
25. Escolaridade do pai do paciente:
 Não Alfabetizado Ensino Médio Completo
 Alfabetizado Ensino Superior Incompleto
 Ensino Fundamental Incompleto Ensino Superior Completo
 Ensino Fundamental Completo Não se aplica
 Ensino Médio Incompleto Sem informação

PROJETO CRÂNIO-FACE BRASIL

FORMULÁRIO DE PRIMEIRA CONSULTA FENDA OROFACIAL



D Informações gerais referentes à mãe do paciente

26. Data de nascimento da mãe do paciente: _____
27. Município e UF de nascimento da mãe do paciente: _____
28. Escolaridade da mãe do paciente:
- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Não Alfabetizado | <input type="radio"/> Ensino Médio Completo |
| <input type="radio"/> Alfabetizado | <input type="radio"/> Ensino Superior Incompleto |
| <input type="radio"/> Ensino Fundamental Incompleto | <input type="radio"/> Ensino Superior Completo |
| <input type="radio"/> Ensino Fundamental Completo | <input type="radio"/> Não se aplica |
| <input type="radio"/> Ensino Médio Incompleto | <input type="radio"/> Sem informação |

E Informações sobre o diagnóstico da fenda orofacial

29. Em que idade iniciou o acompanhamento especializado: _____
30. Época da suspeita ou do diagnóstico da fenda labial:
- | | |
|---|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Período pré-natal | <input type="radio"/> Sem informação |
| <input type="radio"/> Período pós-natal – Quantos dias: _____ | <input type="radio"/> Não se aplica |
31. Época da suspeita ou do diagnóstico da fenda do palato:
- | | |
|---|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Período pré-natal | <input type="radio"/> Sem informação |
| <input type="radio"/> Período pós-natal – Quantos dias: _____ | <input type="radio"/> Não se aplica |

F Antecedentes Pessoais Relevantes

32. Já realizou cirurgia para correção da fenda orofacial:
- | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Sim | <input type="radio"/> Não | <input type="radio"/> Sem informação |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
33. Realizou alguma outra cirurgia(s):
- | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Sim | <input type="radio"/> Não | <input type="radio"/> Sem informação |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|

34. Se o paciente já realizou cirurgia(s), relacionadas ou não a fenda orofacial, preencha o quadro abaixo, complementando a informação a cada consulta subsequente:

Data da cirurgia	Idade do paciente	Especificação do procedimento	Município/UF	Nome do hospital

35. Problemas de saúde no período entre nascimento e a presente data, não relacionados aos procedimentos cirúrgicos de correção da fenda orofacial:

- | | |
|---------------------------|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Sim | <input type="radio"/> Sem informação |
| <input type="radio"/> Não | |

Se houve problemas de saúde não relacionados aos procedimentos cirúrgicos de correção da fenda orofacial, por favor, especifique-os:

36. Anemia:
- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Não | <input type="radio"/> Sem informação |
| <input type="radio"/> Sim – Descreva: | |

PROJETO CRÂNIO-FACE BRASIL
FORMULÁRIO DE PRIMEIRA CONSULTA
FENDA OROFACIAL



37. Otite de repetição:
 Não Sem informação
 Sim – Descreva:

38. Pneumonia de repetição:
 Não Sem informação
 Sim – Descreva:

39. Convulsões:
 Não Sem informação
 Sim – Descreva:

40. Outros problemas de saúde:
 Não
 Sim – Descreva:

G Informações sobre desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM)

Marcos esperados de DNPM:

- Sorriso - 2 meses
- Firmar a cabeça - 3-4 meses
- Sentar com apoio - 4-5 meses
- Sentar sem apoio - 6-8 meses
- Falar palavras - 8-14 meses
- Andar sem auxílio - 10-14 meses
- Falar frases - 10-24 meses
- Controle dos esfíncteres anal e vesical - a partir de 18 meses

41. Marcos do desenvolvimento:

Tipo de marco	Status do marco	Idade que atingiu (em meses)
Sorriu		
Sustentou a cabeça		
Sentou com apoio		
Sentou sem apoio		
Engatinhou		
Ficou de pé com apoio		
Andou sem apoio		
Falou palavras		
Falou frases		
Controlou esfíncter anal – período diurno		
Controlou esfíncter anal – período noturno		
Controlou esfíncter vesical – período diurno		
Controlou esfíncter vesical – período noturno		

PROJETO CRÂNIO-FACE BRASIL
FORMULÁRIO DE PRIMEIRA CONSULTA
FENDA OROFACIAL



42. Desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM):

- | | |
|--|---|
| <input type="radio"/> Normal | <input type="radio"/> Atraso motor e de comportamento |
| <input type="radio"/> Atraso apenas na linguagem | <input type="radio"/> Atraso de linguagem e comportamento |
| <input type="radio"/> Atraso apenas motor | <input type="radio"/> Atraso motor, linguagem e comportamento |
| <input type="radio"/> Atraso apenas de comportamento | <input type="radio"/> Não se aplica |
| <input type="radio"/> Atraso motor e de linguagem | <input type="radio"/> Sem informação |

43. Dificuldade de aprendizagem (a partir dos 10 anos):

- | | |
|---------------------------|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Sim | <input type="radio"/> Não se aplica |
| <input type="radio"/> Não | <input type="radio"/> Sem informação |

44. Deficiência intelectual (mediante a avaliação formal do perfil cognitivo) (a partir dos 7 anos):

- | | |
|--|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Sim | <input type="radio"/> Não se aplica |
| <input type="radio"/> Não | <input type="radio"/> Sem informação |
| <input type="radio"/> Sem avaliação formal | |

45. Durante esta consulta, você avalia que o paciente tem:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Inteligência normal | <input type="radio"/> Déficit intelectual estabelecido |
| <input type="radio"/> Quadro sugestivo de déficit intelectual | <input type="radio"/> Não se aplica |

46. Realização de terapias de apoio:

- | | |
|---------------------------|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Sim | <input type="radio"/> Não se aplica |
| <input type="radio"/> Não | <input type="radio"/> Sem informação |

47. Tipo(s) de terapia de apoio:

- | | |
|--|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Fonoaudiologia | <input type="checkbox"/> Fisioterapia |
| <input type="checkbox"/> Terapia Ocupacional | |
| <input type="checkbox"/> Outra – Descreva: _____ | |

H Informações sobre história obstétrica materna, história médica e medicamentosa da mãe no período de 3 meses antes até o final da gravidez do paciente

48. Esta gravidez foi:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Espontânea | <input type="radio"/> Sem informação |
| <input type="radio"/> Induzida – Método: _____ | |

49. Tabagismo pela mãe:

- | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Sim | <input type="radio"/> Não | <input type="radio"/> Sem informação |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|

50. Consumo de álcool pela mãe:

- | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Sim | <input type="radio"/> Não | <input type="radio"/> Sem informação |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|

51. Consumo de drogas ilícitas:

- | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Sim | <input type="radio"/> Não | <input type="radio"/> Sem informação |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|

Obrigatório responder esta pergunta caso tenha respondido afirmativamente a questão anterior:

52. Se afirmativo, especifique o tipo de droga:

- | | |
|---|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Sem informação | <input type="checkbox"/> Ecstasy |
| <input type="checkbox"/> Cocaína | <input type="checkbox"/> LSD |
| <input type="checkbox"/> Crack | <input type="checkbox"/> Maconha |
| <input type="checkbox"/> Outros – Qual: _____ | |

53. Diagnóstico de epilepsia:

- | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Sim | <input type="radio"/> Não | <input type="radio"/> Sem informação |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|

54. Diagnóstico de diabetes:

- | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <input type="radio"/> Sim | <input type="radio"/> Não | <input type="radio"/> Sem informação |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|

PROJETO CRÂNIO-FACE BRASIL
FORMULÁRIO DE PRIMEIRA CONSULTA
FENDA OROFACIAL



55. Diagnóstico de obesidade:
 Sim Não Sem informação
56. Diagnóstico de artéria umbilical única:
 Sim Não Sem informação
57. Outros diagnósticos:
 Não Sem informação
 Sim – Descreva: _____
58. Exposições da mãe a outras substâncias (inclusive medicamentos) durante a gestação:
 Não Sem informação
 Sim – Quais: _____
59. Grupos de Ocupação: _____
60. Ocupação da mãe: _____
61. Exposição ocupacional da mãe a agentes químicos ou solventes:

62. Outras intercorrências durante a gestação:
 Não Sem informação
 Sim – Quais: _____
63. Tentativa de interrupção da gravidez:
 Sim – Descreva: _____
 Não Sem informação

I Informações sobre o parto e nascimento

64. Duração da gestação:
 Termo Pós-termo
 Pré-termo Sem informação
65. Relação de peso ao nascimento X idade gestacional:
 PIG (abaixo do percentil 10) GIG (acima do percentil 90)
 AIG (entre percentil 10 e 90) Sem informação
66. Local do parto:
 Maternidade Outro
 Domicílio Sem informação
67. Tipo de parto:
 Cesariano Vaginal
 Fórceps Sem informação
68. Intercorrências neonatais:
 Sim Não Sem informação

Obrigatório responder esta pergunta caso tenha respondido afirmativamente a questão anterior:

69. Se afirmativo, assinale qual/quais:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Convulsões | <input type="checkbox"/> Infecção |
| <input type="checkbox"/> Desconforto respiratório | <input type="checkbox"/> Intubação e ventilação mecânica |
| <input type="checkbox"/> Hipocalcemia | <input type="checkbox"/> Parada cardio-respiratória |
| <input type="checkbox"/> Hipoglicemia | <input type="checkbox"/> Sucção débil |
| <input type="checkbox"/> Hipotonia | <input type="checkbox"/> Vômitos |
| <input type="checkbox"/> Icterícia | |
| <input type="checkbox"/> Outras – Quais: | |

70. Alta da maternidade: ____ dias de vida

Dados Antropométricos ao nascimento

Para os percentis: encontrar o intervalo adequado com base no valor exato calculado pelo WHO Anthro ou WHO AnthroPlus:

71. Peso ao nascimento: _____ g – Percentil: _____
72. Comprimento ao nascimento: _____ cm – Percentil: _____
73. Perímetro Cefálico ao nascimento: _____ cm – Percentil: _____
74. Apgar 1º minuto: _____
75. Apgar 5º minuto: _____
76. Apgar 10º minuto: _____
77. Capurro: _____
78. Gemelaridade:
- Sim Não Sem informação
79. Tipo de gemelaridade:
- Monozigóticos Dizigóticos Sem informação

J Informações sobre a ascendência paterna

80. País de nascimento da avó paterna:
- Brasil Outro: _____
81. País de nascimento do avô paterno:
- Brasil Outro: _____
82. Ascendência étnica do pai do paciente. Assinale todas as alternativas mencionadas durante a consulta:
- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Nativa (Indígena+Europeia Latina+Africana) | <input type="checkbox"/> Oriental |
| <input type="checkbox"/> Europeia Latina | <input type="checkbox"/> Árabe |
| <input type="checkbox"/> Africana | <input type="checkbox"/> Indígena |
| <input type="checkbox"/> Europeia não-latina | <input type="checkbox"/> Outra – Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Judaica | <input type="checkbox"/> Sem informação |

K Informações sobre a ascendência materna

83. País de nascimento da avó materna:
- Brasil Outro: _____
84. País de nascimento do avô materno:
- Brasil Outro: _____

PROJETO CRÂNIO-FACE BRASIL
FORMULÁRIO DE PRIMEIRA CONSULTA
FENDA OROFACIAL



85. Ascendência étnica da mãe do paciente. Assinale todas as alternativas mencionadas durante a consulta:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Nativa (Indígena+Europeia Latina+Africana) | <input type="checkbox"/> Oriental |
| <input type="checkbox"/> Europeia Latina | <input type="checkbox"/> Árabe |
| <input type="checkbox"/> Africana | <input type="checkbox"/> Indígena |
| <input type="checkbox"/> Europeia não-latina | <input type="checkbox"/> Outra – Qual: _____ |
| <input type="checkbox"/> Judaica | <input type="checkbox"/> Sem informação |

Antecedentes familiares

86. Consanguinidade entre os genitores:

- Sim – Descreva: _____
 Possível Não Sem informação

87. Número total de gravidezes incluindo o paciente, nativos, natimortos e abortos (Lembre-se que gêmeos correspondem a 1 gravidez): _____

88. Se há pelo menos uma gravidez, por favor, preencha o quadro abaixo:

Ordem de nascimento ou nº do indivíduo no heredograma	Status (nativo, natimorto, aborto)	Gemelaridade (S, N)	Sexo (M, F)	Nome	Presença de Fenda Orofacial (S, N)	Caso registrado no PCFB (S, N)	Presença de outros defeitos (S, N)

89. Caso(s) de fendas orofaciais em algum outro parente:

- Sim Não Sem informação

90. Outras alterações de palato em outros parentes (exceto Fenda):

- Sim Não Sem informação

91. Se há casos de fendas orofaciais em qualquer parente (inclusive irmãos) do paciente, por favor, preencha o quadro abaixo:

Nº do indivíduo no heredograma	Parentesco	Nome	Tipo de fenda (utilize CID10)	Defeitos congênitos (S, N)	Paciente registrado no PCFB (S, N)	Examinado por você? (S, N)	Sexo do Parente (M, F)

M Exame Físico

Dados Antropométricos Atuais

Para os percentis: encontrar o intervalo adequado com base no valor exato calculado pelo WHO Anthro ou WHO AnthroPlus. Para percentil de PC de crianças MAIORES de 5 anos usar o gráfico Smith:

92. Peso atual: _____ g – Percentil: _____

93. Comprimento/estatura atual: _____ cm – Percentil: _____

94. Perímetro Cefálico atual: _____ cm – Percentil: _____

95. Preencha o quadro para descrição anatômica da fenda labial, labiopalatal ou palatal:

	Lado direito		Região mediana	Lado esquerdo	
F. Simonart					
Lábio					
Alvéolo					
Palato duro					
Palato mole					

96. Você teve dificuldade para classificar a fenda devido à manipulação cirúrgica prévia:

Sim Não Sem informação

97. Essa dificuldade ocorreu na classificação da fenda de:

Lábio Palato duro
 Alvéolo Palato mole

98. Presença de outros defeitos na região craniofacial:

Sim Não

Se há outros defeitos na região craniofacial, por favor, assinale abaixo:

Crânio e/ou encéfalo:

99. Crânio:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Assimetria sem sinostose (HP:0002678) | <input type="checkbox"/> Fontanelas pequenas (HP:0005486) |
| <input type="checkbox"/> Bossa frontal (HP:0002007) | <input type="checkbox"/> Macrocefalia (sem hidrocefalia) (HP:0000256) |
| <input type="checkbox"/> Craniossinostose (HP:0001363) | <input type="checkbox"/> Microcefalia (HP:0000252) |
| <input type="checkbox"/> Cristas supraorbitárias proeminentes ou hipoplásticas | <input type="checkbox"/> Occipital plano (HP:0005469) |
| <input type="checkbox"/> Deformidades do crânio sem sinostose (HP:0000929) | <input type="checkbox"/> Occipital proeminente (HP:0000269) |
| <input type="checkbox"/> Diâmetro bifrontal diminuído (HP:0004422) | <input type="checkbox"/> Osteófito occipital (HP:0012294) |
| <input type="checkbox"/> Dolicocefalia (HP:0000268) | <input type="checkbox"/> Plagiocefalia sem sinostose (HP:0001357) |
| <input type="checkbox"/> Fontanela acessória (HP:0012367) | <input type="checkbox"/> Sutura metópica aberta até o Bregma (HP:0005556) |
| <input type="checkbox"/> Fontanelas amplas (HP:0000239) | |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

PROJETO CRÂNIO-FACE BRASIL
FORMULÁRIO DE PRIMEIRA CONSULTA
FENDA OROFACIAL



100. Cabelo e couro cabeludo:

- Alopecia totalis (HP:0007418)
- Alterações de pigmentação de cabelos (HP:0009887)
- Cabelos com baixa implantação na nuca (HP:0002162)
- Outros defeitos não listados – Descreva:
- Cabelos com padrão anômalo, cabelos dirigidos para cima ou anomalias de redemoinho (HP:0011361)
- Cabelos ressecados, quebradiços, grossos ou esparsos (HP:0010719)
- Defeitos de couro cabeludo (HP:0001965)

101. Encéfalo:

- Agenesia de corpo caloso (HP:0001274)
- Anencefalia (HP:0002323)
- Anomalia de Arnold-Chiari (HP:0002308)
- Anomalia de Dandy Walker (HP:0001305)
- Anomalias de *septum pellucidum* (HP:0007375)
- Aplasia/hipoplasia de cerebelo (HP:0007360)
- Defeitos de formação e migração neuronal (HP:0002269)
- Disgenesia de corpo caloso (HP:0006996)
- Outros defeitos não listados – Descreva:
- Encefalocelos (HP:0002084)
- Hidrocefalia (exceto secundária a hemorragia intraventricular) (HP:0000238)
- Hidrocefalia secundária a hemorragia intraventricular (HP:0000238)

102. Orelhas:

- Anotia (HP:0008772)
- Apêndices pós-auriculares (HP:0004451)
- Apêndices, seios, cistos, orifícios/pits ou fístula pré-auriculares (HP:0000383)
- Assimetria de tamanho (HP:0010722)
- Aurícula acessória (HP:01000687)
- Ausência de tragus (HP:0011268)
- Formato rudimentar (orelha pequena com semelhança a brotos embrionários) (HP:0011267)
- Hélix incompleta, espessada ou sobredobrada (HP:0011039)
- Lóbulo duplo (HP:0000363)
- Outros defeitos não listados – Descreva:
- Macrota/orelha alargada (HP:0000400)
- Meato auditivo externo estreito (HP:0000402)
- Microtia (hipoplasia de orelha) (HP:0008551)
- Orelha com prega na helix ou no lóbulo (HP:0008523)
- Orelha de implantação baixa (HP:0000369)
- Orelha dismórfica (em couve-flor, pontuda, achatada no terço superior, etc) (HP:0000377)
- Orelha proeminente (HP:0000412)
- Orelha rodada posteriormente (HP:0000358)
- Orifícios (pit) pós auriculares (HP:0008523)
- Tubérculo de Darwin (HP:0011261)

103. Face (inclui maxila e mandíbula):

- Agnatia (HP:0009117)
- Assimetria facial (HP:0000324)
- Face alongada (HP:0000276)
- Fenda ou agenesia de zigomático (HP:0005557)
- Hipoplasia de mandíbula (HP:0000347)
- Hipoplasia de zigomático (HP:0010669)
- Micrognatia significativa com ou sem glossoptose
- Outros defeitos não listados – Descreva:
- Outras deformidades congênicas da face e da mandíbula (HP:0000271)
- Paralisia facial (HP:0010628)
- Perfil facial achatado (HP:0012368)
- Prognatia (HP:0000303)
- Retrognatia (HP:0000278)

Olhos:

104. Sobrancelhas, cílios e pálpebras:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Blefarofimose (diminuição da abertura palpebral/fendas palpebrais estreitas (HP:0000581)) | <input type="checkbox"/> Fenda palpebral oblíqua superior ou inferior (HP:0200006) |
| <input type="checkbox"/> Cílios ausentes ou rarefeitos (HP:0000561) | <input type="checkbox"/> Fendas palpebrais pequenas (comprimento abaixo de dois desvios padrões) |
| <input type="checkbox"/> Cílios longos (HP:0000527) | <input type="checkbox"/> Fusão completa de pálpebras (HP:0009755) |
| <input type="checkbox"/> Coloboma de pálpebra (HP:0000625) | <input type="checkbox"/> Pálpebras <i>hooded</i> |
| <input type="checkbox"/> Distiquíase (HP:0009743) | <input type="checkbox"/> Pregas epicânticas (HP:0000286) |
| <input type="checkbox"/> Distopia <i>cantorum</i> (HP:0000506) | <input type="checkbox"/> Ptose palpebral (HP:0000508) |
| <input type="checkbox"/> Estrópio (HP:0000656) | <input type="checkbox"/> Sinofrismo ou sobrancelhas rarefeitas (HP:0000534) |
| <input type="checkbox"/> Entrópio (HP:0000621) | |
| <input type="checkbox"/> Epicanto invertido (HP:0000537) | |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

105. Globo ocular:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Aniridia (HP:0000526) | <input type="checkbox"/> Hipotelorismo (mensurado) com indicação cirúrgica (HP:0000601) |
| <input type="checkbox"/> Anomalia de pigmentação da íris (HP:0008034) | <input type="checkbox"/> Hipotelorismo (mensurado) sem indicação cirúrgica (HP:0000601) |
| <input type="checkbox"/> Cisto dermóide epibulbar (HP:0200040) | <input type="checkbox"/> Manchas de Brushfield (HP:0001088) |
| <input type="checkbox"/> Coloboma ocular (HP:0000589) | <input type="checkbox"/> Microftalmia/anoftalmia/criptoftalmia (HP:0100887) |
| <input type="checkbox"/> Esclerótica azulada (HP:0000592) | <input type="checkbox"/> Nistagmo (HP:0000639) |
| <input type="checkbox"/> Estrabismo (esotropia e exotropia) (HP:0000486) | <input type="checkbox"/> Obstrução, estenose ou estreitamento de ducto nasolacrimal (HP:0000614) |
| <input type="checkbox"/> Exoftalmia (HP:0000520) | <input type="checkbox"/> Sardas na íris (HP:0200064) |
| <input type="checkbox"/> Hipertelorismo (mensurado) com indicação cirúrgica (HP:0000316) | |
| <input type="checkbox"/> Hipertelorismo (mensurado) sem indicação cirúrgica (HP:0000316) | |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

106. Nariz:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Asas nasais hipoplásicas ou com incisuras/hipoplasia alar (HP:0009924) | <input type="checkbox"/> Nariz bulboso (HP:0000414) |
| <input type="checkbox"/> Atresia de coanas (HP:0000453) | <input type="checkbox"/> Nariz tubular |
| <input type="checkbox"/> Columela curta ou longa (HP:0009929) | <input type="checkbox"/> Ponta nasal bífida discreta (HP:0011803) |
| <input type="checkbox"/> Desvio de septo nasal (HP:0004411) | <input type="checkbox"/> Ponta nasal bífida significativa (HP:0011803) |
| <input type="checkbox"/> Narinas antevertidas (HP:0000463) | <input type="checkbox"/> Ponte nasal baixa ou larga (HP:0000431) |
| <input type="checkbox"/> Narinas pequenas (HP:0009933) | <input type="checkbox"/> Ponte nasal proeminente (HP:0000426) |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | <input type="checkbox"/> Raiz nasal alta (HP:0000426) |

PROJETO CRÂNIO-FACE BRASIL
FORMULÁRIO DE PRIMEIRA CONSULTA
FENDA OROFACIAL



Região oral:

107. Região perioral e lábios:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Boca grande (macrostomia) (HP:0000154) | <input type="checkbox"/> Fosseta, depressão ou orifício/pit em comissuras bucais (HP:0002710) |
| <input type="checkbox"/> Boca pequena (microstomia) (HP:0000160) | <input type="checkbox"/> Freios labiais aberrantes (HP:0000191) |
| <input type="checkbox"/> <i>Filtrum</i> apagado (HP:0000319) | <input type="checkbox"/> Lábios espessos (HP:0012471) |
| <input type="checkbox"/> Fosseta, depressão ou orifício/pit labial (HP:0100267) | <input type="checkbox"/> Lábios finos (HP:0000233) |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | <input type="checkbox"/> Macroqueilia |

108. Cavidade oral:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Anodontia (HP:0000674) | <input type="checkbox"/> Dentes neonatais (HP:0000695) |
| <input type="checkbox"/> Anomalias do número de dentes (exceto anodontia) (HP:0006483) | <input type="checkbox"/> Hipoplasia de esmalte (HP:0006297) |
| <input type="checkbox"/> Anquiloglossia (língua em gravata) (HP:0010296) | <input type="checkbox"/> Língua grande (macroglossia) (HP:0000158) |
| <input type="checkbox"/> Ausência de freio lingual | <input type="checkbox"/> Língua pequena (microglossia) (HP:0000171) |
| <input type="checkbox"/> Borda alveolar alargada (HP:0000187) | <input type="checkbox"/> Palato alto e arqueado (HP:0000218) |
| <input type="checkbox"/> Dentes malformados (HP:0011061) | <input type="checkbox"/> Palato com fenda submucosa (HP:0000176) |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | <input type="checkbox"/> Úvula bifida (HP:0000193) |

109. Presença de defeitos em outras regiões anatômicas:

- Sim Não

Se há defeitos encontrados em qualquer outra região anatômica, por favor, assinale abaixo:

110. Pescoço:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Ausência de timo (HP:0005359) | <input type="checkbox"/> Seio, fístula ou cisto de arco branquial (HP:0009794) |
| <input type="checkbox"/> Higroma cístico (HP:0000476) | <input type="checkbox"/> Hipertrofia do timo e outros distúrbios tímicos (exceto ausência) (HP:0000777) |
| <input type="checkbox"/> Pele redundante (HP:0005989) | <input type="checkbox"/> Torcicolo (HP:0005988) |
| <input type="checkbox"/> Pescoço curto (HP:0000470) | |
| <input type="checkbox"/> Prega nuca/Pterígio (HP:0000465) | |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

Sistema Musculoesquelético e parede abdominal:

111. Tórax:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Anomalia de Klippel-Feil (HP:0004602) | <input type="checkbox"/> Hipoplasia/agenesia sacral (HP:0008517) |
| <input type="checkbox"/> Anomalia de Sprengel (HP:0000912) | <input type="checkbox"/> Hipoplasia/aplasia de peitoral maior (HP:0005258) |
| <input type="checkbox"/> Bifurcação de costela (HP:0000892) | <input type="checkbox"/> Mamilo acessório (HP:0002558) |
| <input type="checkbox"/> Costela cervical (HP:0000891) | <input type="checkbox"/> Mamilo invertido (HP:0003186) |
| <input type="checkbox"/> Deformidades coluna vertebral (HP:0000925) | <input type="checkbox"/> Mamilo pequeno, hipoplásico ou ausente (HP:0006709) |
| <input type="checkbox"/> Deformidades de esterno (peito escavado ou carinato) (HP:0000766) | <input type="checkbox"/> Mamilo de implantação baixa (HP:0002562) |
| <input type="checkbox"/> Espinha bífida oculta (HP:0003298) | <input type="checkbox"/> Meningomielocele ou meningocele (HP:0002435) |
| <input type="checkbox"/> Espinha bífida (HP:0002414) | <input type="checkbox"/> Outras anomalias de costela (HP:0000772) |
| <input type="checkbox"/> Fóvea (cova) em região sacral ou cocígea (HP:0000960) | <input type="checkbox"/> Outras anomalias de vértebras (HP:0003468) |
| <input type="checkbox"/> Fusão vertebral (exceto Klippel Feil) (HP:0002948) | <input type="checkbox"/> Processo xifóide bífido (HP:0010309) |
| <input type="checkbox"/> Hipertelorismo mamilar (HP:0006610) | <input type="checkbox"/> Tórax assimétrico (HP:0001555) |
| <input type="checkbox"/> Hipoplasia/agenesia de clavículas (HP:0006710) | <input type="checkbox"/> Tórax em colete, barril, armadura (HP:0001552) |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

112. Parede abdominal:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Anomalia de umbigo, implantação umbilical baixa ou hérnia umbilical (HP:0001551) | <input type="checkbox"/> Hérnia inguinal em meninas (quando peso ao nascimento >= 2500 gramas) (HP:0000023) |
| <input type="checkbox"/> Ausência de músculos retos abdominais (HP:0005199) | <input type="checkbox"/> Hérnia inguinal em meninos (HP:0000023) |
| <input type="checkbox"/> Diástase de retos abdominais (HP:0001540) | <input type="checkbox"/> História de artéria umbilical única (HP:0001195) |
| <input type="checkbox"/> Gastrosquise (HP:0001543) | <input type="checkbox"/> Onfalocele (HP:0001539) |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

113. Membros (exceto mãos e pés):

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Anel de constrição (HP:0009775) | <input type="checkbox"/> Deformidades em varo (HP:0002970) |
| <input type="checkbox"/> Anteversão do fêmur (HP:0002980) | <input type="checkbox"/> Deformidades em recurvato (HP:0002816) |
| <input type="checkbox"/> Arqueamento de braço, antebraço, coxa ou perna (HP:0002980) | <input type="checkbox"/> Fóvea (cova) em ombros (HP:0010782) |
| <input type="checkbox"/> Artrogripose (HP:0011729) | <input type="checkbox"/> Hiperextensibilidade das articulações (HP:0001382) |
| <input type="checkbox"/> Assimetria entre membros (HP:0100556) | <input type="checkbox"/> Luxação congênita de quadril (HP:0001374) |
| <input type="checkbox"/> Ausência completa ou parcial de membros (HP:0009815) | <input type="checkbox"/> Subluxação ou clique de quadril (HP:0002827) |
| <input type="checkbox"/> Deformidades em valgo (HP:0002857) | <input type="checkbox"/> Torção de tíbia (HP:0100694) |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

PROJETO CRÂNIO-FACE BRASIL
FORMULÁRIO DE PRIMEIRA CONSULTA
FENDA OROFACIAL



114. Mãos:

- Braquidactilia (mãos) (HP:0001156)
- Camptodactilia (mãos) (HP:0100490)
- Clinodactilia do 5º dedo (mão) (HP:0004220)
- Dedos afilados (mãos) (HP:0001238)
- Dedos alongados (mãos) (HP:0100807)
- Dedos encurtados (mãos) (HP:0009381)
- Defeitos transversos terminais (exceto ectrodactilia) (mãos) (HP:0005927)
- Desvio ou sobreposição de dedos (mãos) (HP:0004097)
- Ectrodactilia (mãos) (HP:0001171)
- Encurtamento do 4º dedo (mão) (HP:0009280)
- Encurtamento do 5º dedo (mão) (HP:0009237)
- Outros defeitos não listados – Descreva:
- Encurtamento do 4º metacarpo (HP:0010042)
- Oligodactilia (redução do número de dedos) (mãos) (HP:0001180)
- Polegar alargado ou trifalângico (HP:0009602)
- Polidactilia pós-axial articulada (mãos) (HP:0001162)
- Polidactilia pós-axial mínima em Afro-Americanos (mãos) (HP:0005676)
- Polidactilia pré-axial (mãos) (HP:0001177)
- Prega palmar única (HP:0000954)
- Pregas palmares/interfalangeas extras ou ausentes (HP:0006143)
- Sindactilia cutânea com +/- sinostose (mãos) (HP:0010554)

115. Pés:

- Aumento de espaço entre o hálux e segundo dedo do pé (HP:0001852)
- Braquidactilia (pés) (HP:0001156)
- Calcâneo proeminente (HP:0012428)
- Camptodactilia (pés) (HP:0001836)
- Clinodactilia (pés) (HP:0003795)
- Dedos afilados (pés) (HP:0011308)
- Dedos alongados (pés) (HP:0010511)
- Dedos encurtados (pés) (HP:0001831)
- Defeitos transversos terminais (exceto ectrodactilia) (pés) (HP:0006494)
- Desvio ou sobreposição dos dedos (pés) (HP:0100498)
- Ectrodactilia (pés) (HP:0001839)
- Encurtamento do 4º metatarso (HP:0004689)
- Espaçamento entre 4º e 5º dedos (pés) (HP:0008094)
- Excesso de pregas plantares (HP:0008113)
- Outros defeitos não listados – Descreva:
- Hálux curto, alargado, valgo ou varo (HP:0001844)
- Metatarso varo ou aduto (HP:0001840)
- Oligodactilia (redução do número de dedos) (pés) (HP:0001849)
- Pé em cadeira de balanço, cavo, valgo ou torto redutível (HP:0005656)
- Pé torto não redutível (HP:0001883)
- Polidactilia pós-axial articulada (pés) (HP:0100259)
- Polidactilia pré-axial (pés) (HP:0001841)
- Sindactilia cutânea com +/- sinostose (exceto sindactilia cutânea de 2º e 3º dedos) (pés) (HP:0010621)
- Sindactilia cutânea de 2º e 3º dedos (pés) (HP:0004691)
- Sulco plantar profundo (HP:0001869)

116. Sistema Cardiovascular:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Anel vascular (HP:0010775) | <input type="checkbox"/> Hipertrofia ventricular (HP:0001714) |
| <input type="checkbox"/> Arco aórtico à direita (HP:0012020) | <input type="checkbox"/> Insuficiência de valva aórtica (HP:0001659) |
| <input type="checkbox"/> Arco aórtico cervical (HP:0011588) | <input type="checkbox"/> Insuficiência de valva mitral (HP:0001653) |
| <input type="checkbox"/> Artérias colaterais aórtico-pulmonares mais calibrosas | <input type="checkbox"/> Insuficiência de valva pulmonar (HP:0010444) |
| <input type="checkbox"/> Coarctação de aorta (HP:0001680) | <input type="checkbox"/> Insuficiência de valva tricúspide (HP:0005180) |
| <input type="checkbox"/> Defeitos do septo atrioventricular (HP:0006695) | <input type="checkbox"/> Interrupção do arco aórtico (HP:0011611) |
| <input type="checkbox"/> Defeitos do septo interatrial (CIA) (HP:0001631) | <input type="checkbox"/> Linfangioma (HP:0100764) |
| <input type="checkbox"/> Defeitos do septo interventricular (CIV) (HP:0001629) | <input type="checkbox"/> Miocardiopatia (HP:0001638) |
| <input type="checkbox"/> Defeito de septo interventricular com atresia pulmonar | <input type="checkbox"/> Persistência do canal arterial (PCA) (quando peso ao nascimento \geq 2500g ou idade gestacional \geq 37 semanas) (HP:0001643) |
| <input type="checkbox"/> Dextrocardia (HP:0001651) | <input type="checkbox"/> Regurgitação de valva aórtica discreta (HP:0001659) |
| <input type="checkbox"/> Drenagem anômala de veias pulmonares (HP:0005160) | <input type="checkbox"/> Regurgitação de valva mitral discreta (HP:0001653) |
| <input type="checkbox"/> Dupla via de saída de ventrículo direito (HP:0001719) | <input type="checkbox"/> Tetralogia de Fallot Clássica (HP:0001636) |
| <input type="checkbox"/> Estenose de valva aórtica (HP:0001650) | <input type="checkbox"/> Tetralogia de Fallot com estenose pulmonar (HP:0011679) |
| <input type="checkbox"/> Estenose de valva mitral (HP:0001718) | <input type="checkbox"/> Tetralogia de Fallot com atresia pulmonar (HP:0012516) |
| <input type="checkbox"/> Estenose de valva pulmonar (HP:0001642) | <input type="checkbox"/> Tetralogia de Fallot não especificado |
| <input type="checkbox"/> Estenose periférica de artéria pulmonar (HP:0004969) | <input type="checkbox"/> Transposição de grandes vasos (HP:0001669) |
| <input type="checkbox"/> Forame oval pérvio (quando peso ao nascimento \geq 2500g ou idade gestacional \geq 37 semanas) (HP:0001655) | <input type="checkbox"/> <i>Truncus arteriosus</i> (HP:0001660) |
| <input type="checkbox"/> Hemangioma em face ou pescoço (HP:0001028) | <input type="checkbox"/> Valva aorta bicúspide (HP:0001647) |
| <input type="checkbox"/> Hemangioma grande (diâmetro \geq 10 cm), múltiplo ou cavernoso (HP:0001028) | <input type="checkbox"/> Valva aorta espessada |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | <input type="checkbox"/> Valva pulmonar espessada |

117. Sistema respiratório:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Agenesia de pulmão (HP:0005944) | <input type="checkbox"/> Hipoplasia pulmonar (exceto em prematuros) (HP:0002089) |
| <input type="checkbox"/> Defeitos diafragmáticos (exceto hérnia de hiato) (HP:0000775) | <input type="checkbox"/> Laringomalácia (HP:0001601) |
| <input type="checkbox"/> Estridor laríngeo congênito (HP:0004886) | <input type="checkbox"/> Traqueomalácia (HP:0002779) |
| <input type="checkbox"/> Hérnia de hiato (HP:0002036) | |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

118. Sistema Gastrointestinal:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Ânus imperfurado (HP:0002023) | <input type="checkbox"/> Estenose de piloro (HP:0002021) |
| <input type="checkbox"/> Apêndices anais | <input type="checkbox"/> Estenose/atresia anal/outras alterações de ânus (exceto ânus imperfurado) (HP:0004378) |
| <input type="checkbox"/> Ascite congênita (HP:0001791) | <input type="checkbox"/> Estenose/atresia intestinal (HP:0011100) |
| <input type="checkbox"/> Atresia de esôfago (HP:0002032) | <input type="checkbox"/> Fissuras anais (HP:0012390) |
| <input type="checkbox"/> Atresia de vias e/ou ductos biliares (HP:0005912) | <input type="checkbox"/> Fístula traqueoesofágica (HP:0002575) |
| <input type="checkbox"/> Divertículo de Meckel (HP:0002245) | <input type="checkbox"/> Megacolon ou Hirschsprung (HP:0002251) |
| <input type="checkbox"/> Esplenomegalias e/ou hepatomegalia (HP:0001433) | |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

119. Sistema Urinário:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Agenesia renal (HP:0000104) | <input type="checkbox"/> Hiperplasia renal (HP:0000105) |
| <input type="checkbox"/> Agenesia/atresia ou válvula de uretra/alteração uretral (HP:0000795) | <input type="checkbox"/> Refluxo vesíco-ureteral (HP:0000076) |
| <input type="checkbox"/> Cisto renal único (HP:0012581) | <input type="checkbox"/> Rim ectópico (HP:0000086) |
| <input type="checkbox"/> Cistos renais (HP:0005562) | <input type="checkbox"/> Rim em ferradura (HP:0000085) |
| <input type="checkbox"/> Hidronefrose com dilatação de pelve \geq 10 mm (HP:0000126) | <input type="checkbox"/> Úraco patente ou com cisto (HP:0010478) |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

Genitais:

120. Inspeção visual:

- Ambiguidade genital (0000062)

121. Genitália feminina:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Aderência de pequenos lábios (HP:0000063) | <input type="checkbox"/> Clitoromegalia (mensurado $>$ 6mm) (HP:0000057) |
| <input type="checkbox"/> Anomalia de fusão uterina (HP:0000130) | <input type="checkbox"/> Fusão vulvar (HP:0000148) |
| <input type="checkbox"/> Anomalia de Rokitansky | <input type="checkbox"/> Hipoplasia de grandes lábios (HP:0000059) |
| <input type="checkbox"/> Apêndices vaginais ou himenais | <input type="checkbox"/> Hipoplasia de pequenos lábios (HP:0000064) |
| <input type="checkbox"/> Cisto de vagina, vulva ou canal de Nuck | <input type="checkbox"/> Presença de rafe mediana no clitóris |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

122. Genitália masculina:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Anorquia/microrquidia (mensurada) (HP:0010468) | <input type="checkbox"/> Escroto em cachecol/transposição penoescrotal (HP:0100600) |
| <input type="checkbox"/> Ausência de prepúcio ou prepúcio excessivo ou redundante (HP:0100587) | <input type="checkbox"/> Fimose (HP:0001741) |
| <input type="checkbox"/> Ausência de rafe mediana no pênis | <input type="checkbox"/> Hidrocele (HP:0000034) |
| <input type="checkbox"/> Cordee (HP:0000041) | <input type="checkbox"/> Hipoplasia de testículo (HP:0008734) |
| <input type="checkbox"/> Criptorquidia (quando peso ao nascimento \geq 2500g) (HP:0000028) | <input type="checkbox"/> Hipoplasia escrotal (HP:0000046) |
| <input type="checkbox"/> Criptorquidia não especificada (HP:0000028) | <input type="checkbox"/> Hipospadia (exceto quando meato estiver na glândula) (HP:0000047) |
| <input type="checkbox"/> Criptorquidia persistente após 2 anos de idade (HP:0000028) | <input type="checkbox"/> Hipospadia de glândula (HP:0000807) |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | <input type="checkbox"/> Micropênis (mensurado) (HP:0000054) |
| | <input type="checkbox"/> Pênis pequeno (exceto micropênis mensurado) (HP:0008736) |

PROJETO CRÂNIO-FACE BRASIL
FORMULÁRIO DE PRIMEIRA CONSULTA
FENDA OROFACIAL



123. Pele e anexos:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Apêndices ou cistos cutâneos (HP:0010609) | <input type="checkbox"/> Manchas mongólicas (HP:0011369) |
| <input type="checkbox"/> <i>Cutis marmorata</i> (HP:0000965) | <input type="checkbox"/> <i>Nevus</i> pigmentados (HP:0000995) |
| <input type="checkbox"/> Dermatoglifos incomuns (HP:0007560) | <input type="checkbox"/> Pele hiperextensível (HP:0000974) |
| <input type="checkbox"/> Hipoplasia ungueal (HP:0008386) | <input type="checkbox"/> Unha ausente (HP:0001798) |
| <input type="checkbox"/> Ictiose (HP:0008064) | <input type="checkbox"/> Unha com duplicação (exceto polegar) (HP:0010793) |
| <input type="checkbox"/> Lanugo excessivo ou persistente ou hipertrícase (HP:0011362) | <input type="checkbox"/> Unha do polegar com duplicação (HP:0010793) |
| <input type="checkbox"/> Manchas vinho-do-porto/ <i>Nevus flammeus</i> (HP:0001052) | <input type="checkbox"/> Unhas largas, hipoplásicas, hipertróficas, espessadas, hiperconvexas ou com sulco longitudinal (HP:0001597) |
| <input type="checkbox"/> Manchas café-com-leite (HP:0000957) | |
| <input type="checkbox"/> Manchas despigmentadas ou hiperpigmentadas (HP:0007441) | |
| <input type="checkbox"/> Outros defeitos não listados – Descreva: | |

124. Outros defeitos inespecíficos não listados:

- Sim Não
 Descreva:

N Exames Complementares

Exames Complementares e Fotografias do Paciente

125. Fotografias:

- Sim Não

126. Preencha o quadro com os exames complementares do paciente:

Exame Complementar	Obs do Exame Complementar	Data da solicitação exame	Resultado do Exame Complementar	Data do Resultado

PROJETO CRÂNIO-FACE BRASIL
FORMULÁRIO DE PRIMEIRA CONSULTA
FENDA OROFACIAL



O Hipótese Diagnóstica

127. Preencha o quadro com as hipóteses diagnósticas do paciente:

CID da Fenda Orofacial	Data da HD	Hipótese Diagnóstica	Status do Diagnóstico (Suspeito, Em investigação, Concluído)

128. O paciente apresenta fenda atípica:

Sim Não

129. O paciente apresenta holoprosencefalia:

Sim Microforma Não

130. Há hipótese diagnóstica de Del22q para este paciente:

Sim Não

131. É possível coletar amostra do trio para extração do DNA:

Sim Não

132. Qual o médico responsável em seu serviço por comunicar o resultado da investigação laboratorial para o paciente: _____

133. Coleta de material para biorrepositório:

Data da coleta do material	Tipo de material enviado	Destino do material	Indivíduos coletados

P TCLE Fenda

134. O TCLE do paciente já foi devidamente preenchido e assinado?

Sim Não