

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA – FOP**

LÍVIA MÁRIS RIBEIRO PARANAÍBA
Cirurgiã-Dentista

**ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE IRF6 NA SÍNDROME DE VAN DER
WOUDE E DO POLIMORFISMO V274I (IRF6) EM FISSURAS LÁBIO-
PALATINAS NÃO-SINDRÔMICAS**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Mestre em Estomatopatologia na
Área de Patologia.**

Orientador: Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior

PIRACICABA – SÃO PAULO – BRASIL

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

P212a Paranaíba, Lívia Máris Ribeiro.
Análise de mutações no gene IRF6 na síndrome de van der Woude e do polimorfismo V274I (IRF6) em fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas. / Lívia Máris Ribeiro Paranaíba. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Hercílio Martelli Júnior.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fissuras. 2. Face – Crescimento. 3. Genética. I. Martelli Júnior, Hercílio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Mutations analysis of the IRF6 gene in van der Woude syndrome and of the V274I polymorphism (IRF6) in nonsyndromic cleft lip and/or palate

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Fissures. 2. Face – Growth. 3. Genetics

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Marcos José Burle de Aguiar, Márcio Ajudarte Lopes, Hercílio Martelli Júnior

Data da Defesa: 19-02-2009

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 19 de Fevereiro de 2009, considerou a candidata LÍVIA MARIS RIBEIR PARANAÍBA aprovada.



PROF. DR. HERCÍLIO MARTELLI JUNIOR



PROF. DR. MARCOS JOSÉ BURLE DE AGUIAR



PROF. DR. MARCIO AJUDARTE LOPES

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Nadico (Reinaldo), pelo exemplo de determinação e de coragem que sempre me transmitiu e me norteou. Pai, exemplo de vida.

A minha querida mãe, a incentivadora de todas as horas, minha eterna gratidão.

A toda a família: Breno, Cida, Ueslen, tia Ivone que, direta ou indiretamente, me compreenderam e apoiaram em todos os momentos da minha caminhada.

Aos professores, **Prof. Dr. Hercílio Martelli-Júnior e Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, excelentes profissionais e orientadores, que me incentivaram e guiaram, com sabedoria e compreensão, no início da pesquisa científica.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**;

aos Professores, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior (2007-2008)** e **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta (2008-2009)**, coordenadores, nos respectivos anos, do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

aos Professores, **Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Augustin Vargas, Jacks Jorge Júnior**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela excelência e dedicação ao ensino;

especialmente à participação do **Centro Pró-Sorriso de Alfenas (Centrinho)**, sem o qual esse trabalho não seria possível;

à Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas), Alfenas, Minas Gerais, na pessoa do **Prof. Dr. Mário Sérgio de Oliveira Swerts**, quem viabilizou meu estágio no Centrinho;

aos verdadeiros companheiros de trabalho do Centrinho, **Julian, Elza, Edmilson** e todos os professores, em especial a **Prof. Dra. Letícia Monteiro de Barros**, pela amizade e companheirismo;

aos alunos da UNIFENAS, em especial **Matheus Carvalho de Soares**, pela colaboração na obtenção de muitas amostras de saliva;

ao laboratório de genética da UNIFENAS, na pessoa do **Prof. Dr. Marcelo Boriollo**, por ter possibilitado o uso do laboratório em Alfenas;

à turma do laboratório de biologia molecular, **Débora, Fabiana, Carol Bitu, Michelle Agostini, Lays, Marco**, pelos momentos de trabalho e boas risadas compartilhadas; e, especialmente, à amiga **Andréia Bufalino**, que não mediu esforços para me ajudar no laboratório quando eu estava em Alfenas. Andréia, você foi um espetáculo!!

Aos amigos e colegas da Patologia, **Adrielle, Allan, Andréia, Fernanda, Jorge, Mário, Luís Alcino, Michelle Kellermann, Patrícia, Rebeca e Victor**, pela amizade e pelos momentos de descontração; em especial, à grande amiga **Aninha (Ana Terezinha)**, quem me acolheu quando precisei retornar várias vezes, a Piracicaba;

aos demais funcionários do laboratório de Patologia, **Ana Cristina do Amaral Godoy e Rosa Maria Fornasiari**, pelo auxílio e colaboração;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa para a realização do mestrado;

aos meus primeiros professores de Semiologia e Patologia, **Patrícia Peres Lucif e Alessandro Pereira Costa**, meus pré-cursores;

a todos os voluntários que se dispuseram, com tanto desprendimento, a participar desta pesquisa;

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

Epígrafe

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

Isaac Newton

Resumo

Mutações no gene do fator regulador de interferon 6 (IRF6) têm sido identificadas em afetados pela síndrome de van der Woude (SVW) e polimorfismos em IRF6 foram associados a pacientes com fissura labial e/ou palatina não-sindrômica (FL/PNS). A síndrome de van der Woude (SVW) é uma alteração craniofacial rara, autossômica dominante, caracterizada pela associação de fossetas em lábio inferior e fissura lábio-palatina (FL/P). A presença das fossetas labiais representa a manifestação clínica que distingue a SVW das FL/PNS. O objetivo deste estudo foi identificar mutações no gene IRF6 em membros de duas famílias brasileiras afetadas pela SVW e avaliar a frequência do polimorfismo V274I (rs2235371) em indivíduos com FL/PNS. Membros das duas famílias, afetados e não afetados, foram analisados por seqüenciamento das regiões exônicas do gene IRF6 e as mutações foram confirmadas por digestão com enzima de restrição. O polimorfismo V274I em IRF6 foi analisado por PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase em associação com polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição enzimática) em 241 pacientes com FL/PNS e em 126 indivíduos normais, utilizados como controle. Duas novas mutações foram identificadas nas famílias com SVW: uma mutação com alteração na matriz de leitura, resultante de uma deleção do nucleotídeo G na posição 520 de IRF6 (520delG) e uma mutação por substituição, resultante de uma troca de nucleotídeo T por A na posição 1135 do exon 8 (T1135A) de IRF6. As mutações foram ausentes em todos os indivíduos normais e nos pacientes com FL/PNS, confirmando assim, suas especificidades. Nas famílias afetadas. A presença do polimorfismo V274I foi identificada em 9,5% dos indivíduos do grupo de FL/PNS e em 10,3% dos voluntários do grupo controle. Os resultados deste estudo demonstram que mutações no gene IRF6 estão relacionadas com a etiologia da SVW, mas a presença do polimorfismo V274I não é um fator etiológico isolado para o desenvolvimento de FL/PNS.

Palavras chave: Síndrome de van der Woude, gene do fator regulador de interferon 6, mutação, polimorfismo V274I, fissura lábio-palatina.

Abstract

Mutations in the interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene have been identified in the patients with van der Woude syndrome (VWS) and polymorphisms at the IRF6 are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate (NSCL/P). VWS is a rare autosomal dominant craniofacial disorder characterized by lower lip pits and cleft lip and/or palate. The presence of the lip pits in the lower lip is the only clinical features distinguishing VWS from NSCL/P. The aim of this study was identified IRF6 mutations in the members of the 2 Brazilian families affected by VWS and to evaluate the frequency of the V274I polymorphism (rs2235371) in patients with NSCL/P. Members of the both families, affected and unaffected, were analyzed for sequencing of the IRF6-exonic region, and the mutations were confirmed by restriction enzyme digestion. The IRF6 V274I polymorphism was analyzed by PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction) in 241 patients with NSCL/P and in 126 control individuals. Two novel heterozygous mutations were identified in the families with VWS: a mutation with alteration in the codon-reading, resulting from a deletion of G at the nucleotide position 520 in the exon 6 (520delG), and a substitution mutation, resulting from a change of the single nucleotide T to A at position 1135 in exon 8 (T1135A) of the IRF6. The mutations were absent in all healthy individuals and in all patients with NSCL/P, thus confirming their specificities. The presence of the V274I polymorphism was identified in 9.5% of the NSFL/P group and in 10.3% of the control group. The results of this study show that IRF6 mutations are released with the SVW etiology, but the presence of the V274I polymorphism is not an isolated etiologic factor for development of the NSFL/P.

Key words: Van der Woude syndrome, interferon regulatory factor 6 gene, V274I polymorphism, cleft lip and palate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa – Aminoácido

°C – Graus Celsius

cDNA – *Complementary DNA* – Ácido desoxirribonucléico complementar

DNA – *Deoxyribonucleic* – Ácido desoxirribonucléico

dNTPs – *Deoxynucleoside 5' triphosfato* – Desoxinucleotídeo trifosfato

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FGF – *Factor growth fibroblast* – Fator de crescimento de fibroblasto

FL – Fissura labial

FP – Fissura palatina

FLP – Fissura lábio-palatina

FL/P – Fissura labial e/ou fissura palatina

FL/PNS – Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica

FOP – Faculdade de Odontologia de Piracicaba

IRF6 – *Interferon regulatory factor 6* – Fator regulador de interferon 6

µg – Microgramas

Maspin – *Mammary Serine Protease Inhibitor* – Inibidor de protease serina
mamária

MSX1 – *Muscle Segment Homeobox 1* – Homeobox de segmento muscular 1

ml – Mililitros

mM – Milimolar

nM – Nanomolar

nm – Nanômetro

OD – *Optical density* – Densidade óptica

PBS – *Phosphate bufferes saline* – Solução salina tamponada com fosfato

RNA – *Acid ribonucleic* – Ácido ribonucléico

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase

PCR-RFLP – *PCR – Reaction fragment length polymorphism* - PCR associada à análise de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática

Smad – *Mothers against decapentaplegic (MAD) and the C. elegans protein SMA*

SMIR – *Smad-interferon regulatory* - Regulador de interferon-Smad

SNP – *Single nucleotide polymorphism* - Polimorfismo de nucleotídeo único

SPP – Síndrome pterígio poplíteo

SVW – Síndrome de van der Woude

TBE – *Tris Borate EDTA buffer* - Tampão Tris, ácido bórico e EDTA

TGF- β – *Transforming Growth Factor β* - Fator de Crescimento Transformante β

U – Unidade

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
2.1. Características gerais	3
2.2. Características clínicas	4
2.3. Características genéticas e moleculares	8
2.4. Tratamento	15
2.5. Aconselhamento genético	16
2.6. Diagnóstico diferencial	16
2.7. Fissura labial e/ou palatina (FL/PNS) e <i>single nucleotide polymorphism</i> (SNP)	18
3. Proposição	22
4. Materiais e métodos	23
4.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	23
4.2. Pacientes	23
4.2.1. Afetados pela síndrome de van der Woude e grupos controle	23
4.2.2. Afetados pela FL/PNS e grupo controle	28
4.3. Obtenção das amostras para análise	31
4.4. Isolamento do DNA	31
4.5. PCR e separação eletroforética	31
4.6. Purificação e verificação da concentração do produto de PCR	33
4.7. Reação de sequenciamento e análise dos dados	34
4.8. Confirmação da especificidade das mutações identificadas nas famílias com SVW	34
4.9. Análise do efeito das mutações nas famílias com SVW	35
4.10. Análise do polimorfismo V274I (820G>A) em indivíduos normais e com FL/PNS	35
4.11. Análise estatística	37

5. Resultados	38
5.1. Família 1	38
5.2. Família 2	41
5.3. Tratamento das famílias	44
5.4. Polimorfismo V274I (820G>A)	45
6. Discussão	50
7. Conclusões	59
Referências	60
Anexo (certificado do comitê de ética)	70
Anexo II (Artigo publicado - Novel mutations in the IRF6 gene in Brazilian families with Van der Woude syndrome)	71

1. Introdução

Mutações no gene do fator regulador de interferon 6 (IRF6) têm sido detectadas em pacientes afetados pela SVW e polimorfismos em IRF6 foram associados a pacientes com fissura labial e/ou palatina não-sindrômica (FL/PNS) (Kondo *et al.*, 2002; Zuccherro *et al.*, 2004). A síndrome de van der Woude (SVW) (OMIM #119300) é uma rara alteração craniofacial caracterizada por fossetas em lábio inferior, fissura labial e/ou palatina (FL/P) e, ocasionalmente, hipodontias (Oberoi & Vargervik, 2005; Huang *et al.*, 2007). Essa síndrome ocorre em aproximadamente 2% dos pacientes com FL/P e é distinta da FL/PNS pela presença de fossetas labiais (Janku *et al.*, 1980). A incidência é estimada de 1-2,5 casos por 100.000 nativos (Rizos & Spyropoulos, 2004). A SVW é herdada como um traço autossômico dominante, apresentando alta penetrância e extensa variação na expressividade inter e intra-familiar. No entanto, 30-50% dos casos de SVW representam mutações *de novo* (sem história prévia de ocorrência na família) (Rizos & Spyropoulos, 2004; Item *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007). Mais de 80 diferentes mutações já foram descritas ao longo do gene IRF6 em pacientes com a SVW na literatura científica (Kondo *et al.*, 2002; Kayano *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Gatta *et al.*, 2004; Matsuzawa *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2005; Brosch *et al.*, 2007).

IRF6 pertence a uma família de 9 fatores de transcrição que compartilha um domínio de ligação ao DNA altamente conservado, e um domínio, menos conservado, de interação à proteína na região carboxil terminal chamado domínio de ligação ao fator regulador de interferon-Smad (SMIR) (Takaoka *et al.*, 2008). As mutações na região responsável pela síntese do domínio de ligação ao DNA correspondem a 42% das alterações no gene IRF6, enquanto que as mutações no domínio de ligação à proteína correspondem a 27% (Peyrard *et al.*, 2005). É proposto que as mutações no domínio de ligação ao DNA resultam em uma alteração estrutural e uma inativação do fator de transcrição (Kondo *et al.*, 2002; Ghassibé *et al.*, 2004; Ziai *et al.*, 2005).

Similarmente, mutações por substituição no domínio de ligação à proteína podem alterar a dimerização do fator de transcrição (Kondo *et al.*, 2002; Ghassibé *et al.*, 2004). A maioria dos membros do IRF6 regula a expressão de interferon α e β após a infecção viral (Ozato *et al.*, 2007), mas a exata função do IRF6 permanece desconhecida. Mutações no gene IRF6 também podem causar a síndrome pterígio poplíteo (SPP) (OMIM #119500), que compartilha algumas características com a SVW (Ghassibé *et al.*, 2004).

As características genótípicas e a prevalência de mutações e polimorfismos no gene IRF6 em famílias brasileiras afetadas pela SVW e em pacientes brasileiros com FL/PNS são desconhecidas, além disto, a identificação de tais alterações pode ser importante para uma melhor compreensão de sua participação na patogênese das FL/P, bem como para uma melhor compreensão do papel desse gene no desenvolvimento normal da região craniofacial. Assim, o presente estudo avaliou e identificou novas mutações em duas extensas famílias brasileiras afetadas pela SVW e analisou a frequência do polimorfismo gênico V274I (substituição de uma valina por isoleucina na posição do aminoácido 274, rs 2235371) no gene IRF6 em pacientes com FL/PNS. Na primeira família afetada pela SVW, foram examinados 54 descendentes distribuídos nas últimas cinco gerações, sendo que 12 membros apresentaram uma típica associação de fossetas labiais bilaterais e FL/P completa. A SVW foi transmitida como uma herança autossômica dominante com baixa penetrância. A segunda família foi composta por 17 descendentes, distribuídos em quatro gerações, sendo 8 afetados pela SVW. A segregação da SVW foi consistente como uma herança autossômica dominante, sugerindo uma penetrância completa. Ao contrário da primeira família, existiu uma grande variabilidade na expressão clínica da síndrome. Para a análise do polimorfismo gênico, V274I, presente no gene IRF6 foram analisados 241 pacientes brasileiros com FL/PNS e 126 indivíduos brasileiros normais, utilizados como controle.

2. Revisão de Literatura

2.1. Características gerais

Aproximadamente 1 em cada 500 a 2.500 nativos apresenta algum tipo de fissura orofacial, podendo estar associada ou não a síndromes (Gorlin *et al.*, 2001). Estima-se que mais de 300 síndromes reconhecidas apresentam a fissura orofacial como parte do quadro clínico (Gorlin *et al.*, 2001; Blanton *et al.*, 2005). As fissuras orofaciais mais comuns são as FL/P, que podem ser classificadas, tendo como base anatômica o forame incisivo, em quatro grupos: fissuras pré-forame incisivo ou, simplesmente, fissuras labiais (FL), fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP), fissuras trans-forame incisivo ou fissuras lábio-palatinas (FLP) e fissuras raras da face (Spina *et al.*, 1972). Dentre as síndromes com associação às FL/P, a síndrome de van de Woude (SVW) (MIM #119300), também conhecida como síndrome das fossetas labiais e FL/P (Rizos & Spyropoulos, 2004), é a forma sindrômica mais comum de fissuras orais, afetando aproximadamente 1 em cada 40.000 a 100.000 nativos (Gorlin *et al.*, 2001; Dissemond *et al.*, 2004; Matsuzawa *et al.*, 2004). Em média, aproximadamente 1-2% dos indivíduos com FL/P são afetados pela SVW (Schinzel & Klausler, 1986; Rizos & Spyropoulos, 2004), sendo distinguíveis das fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas (FL/PNS) pela presença das fossetas labiais (Schinzel & Klausler, 1986; Menko *et al.*, 1988; Dissemond *et al.*, 2004). De acordo com estudo realizado no Brasil, avaliando 11.000 indivíduos com FL/P provenientes de um Centro de Pesquisa e Reabilitação para Pacientes com FL/P, a SVW foi identificada em 1,2% dos pacientes investigados (Onofre *et al.*, 1997).

A prevalência esperada para SVW pode ser bastante subestimada, provavelmente devido a muitos pacientes apresentarem malformações labiais, consideradas como microformas (expressões menores) de apresentação das fossetas labiais, que não foram diagnosticados durante um cuidadoso exame clínico (Menko *et al.*, 1988; Onofre *et al.*, 1997), ou ainda, que as fossetas não são consideradas como anomalias do desenvolvimento pelos pacientes que se

esquecem de informá-las ao examinador, principalmente, quando são excisadas durante a infância. Assim, muitas famílias com SVW, provavelmente, passam despercebidas durante um exame clínico cuidadoso (Lacombe *et al.*, 1995). O primeiro relato da SVW ocorreu em 1845 por Demarquaz, sendo posteriormente relatada independentemente por Murray em 1860 e extensivamente revisada em 1954 por van der Woude (van der Woude, 1954).

2.2. Características clínicas

A SVW é uma condição genética sem predileção por gênero ou raça (Rizos & Spyropoulos, 2004; Huang *et al.*, 2007). Esta síndrome é caracterizada pela presença de FL/P e sulcos (também denominados fossetas ou fístulas) característicos no lábio inferior (van der Woude, 1954; Lacombe *et al.*, 1995). No entanto, Item *et al.* (2005) descreveu, pela primeira vez, fossetas em lábio superior em pacientes com SVW, sugerindo uma nova variação.

A forma de apresentação clínica das FL/P varia consideravelmente, apresentando-se desde como fenda palatina submucosa ou úvula bífida até fissura lábio-palatina (FLP) bilateral completa (Huang *et al.*, 2007). O fenótipo sobreposto de FLP com FP ocorrendo na mesma família é muito raro no grupo de pacientes com FL/PNS e fissurados sindrômicos. No entanto, a SVW é uma das poucas formas de síndrome em que a sobreposição (FLP e FP) pode ocorrer (Dissemond *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007). Entre 3 a 81% dos casos, a hipodontia, mais freqüentemente, em ordem decrescente, do segundo pré-molar superior, segundo pré-molar inferior e incisivo lateral superior é encontrada em afetados pela doença (Rizos & Spyropoulos, 2004; Oberoi & Vargervik, 2005). O número de hipodontias na maxila representa quase o dobro quando comparadas as correspondentes em grupos controle (Schinzel & Klausler, 1986). Sugere-se que múltiplos fatores genéticos e ambientais, além de efeitos diretos das fissuras nos tecidos primitivos, estejam envolvidos na patogênese das hipodontias (Oberoi & Vargervik, 2005).

As fossetas do lábio inferior compõem a manifestação clássica desta síndrome (Schinzel & Klausler, 1986; Rizos & Spyropoulos, 2004; Huang *et al.*, 2007). Essa manifestação é uma malformação congênita, apresentando-se tanto de forma isolada (Souto, 2008) quanto associada a outras anomalias, caracterizando-se assim como um quadro sindrômico (Huang *et al.*, 2007). Há evidências de que as fossetas labiais, quando isoladas, apresentam uma herança autossômica dominante, ocorrendo em aproximadamente um a cada 80.000-100.000 caucasianos nascidos e sem predileção por gênero (Dissemond *et al.*, 2004). De maneira geral, as fossetas aparecem como depressões no vermelhão do lábio, variando de uma pequena dobra até um trajeto mucoso com 1 a 25 mm de profundidade (Ziai *et al.*, 2005; Kirzioğlu & Ertürk, 2006), geralmente finalizando-se como um saco cego envolto por glândulas salivares (Lopes *et al.*, 1999; Rizos & Spyropoulos, 2004). Essas depressões ainda podem se estender ao músculo orbicular labial e, em algumas circunstâncias, comunicarem-se ao sistema ductal das glândulas salivares (Souto, 2008). O tamanho do orifício das fossetas pode ser de um diâmetro de 6 mm ou nem mesmo admitir a passagem de um fio de cabelo (Rizos & Spyropoulos, 2004). Três formatos de fosseta labial têm sido relatados: circular ou oval, transversal ou tipo-fenda (fendida) (Rizos & Spyropoulos, 2004). Uma variação fenotípica especial das fossetas labiais (11%) na SVW, constituída por sulcos ou elevações cônicas em região de mucosa labial, tem sido erroneamente diagnosticada como lábio duplo ou endentações no lábio inferior (Rizos & Spyropoulos, 2004). Embora formas unilaterais e centrais já tenham sido descritas, a maioria das fossetas é simetricamente situada em ambos os lados da linha média do lábio inferior (Dissemond *et al.*, 2004; Ziai *et al.*, 2005; Junior *et al.*, 2006). O tecido adjacente à fosseta geralmente sofre hiperplasia, que pode mascarar sua abertura e acentuar a sua deformação (Dissemond *et al.*, 2004; Ziai *et al.*, 2005).

As fossetas labiais, quando representam a única manifestação da SVW, são consideradas formas incompletas de expressão (Dissemond *et al.*, 2004;

Souto, 2008). As fossetas são assintomáticas, mas, dependendo da profundidade, podem apresentar comunicação com glândulas salivares menores e um líquido claro e viscoso pode ser secretado por estas estruturas, o que facilita a instalação de um processo infeccioso e a presença de sintomatologia (Ziai *et al.*, 2005; Kirzioğlu & Ertürk, 2006). A etiologia das fossetas labiais inferiores e suas variações podem ser explicadas pela redução incompleta das elevações laterais do lábio inferior quando os processos de crescimento mandibular estão alterados, ocorrendo entre o 36° e 50° dia de vida embriogênica (Rizos & Spyropoulos, 2004). É normalmente nesse período que a fusão do lábio e palato ocorre simultaneamente (Schinzel & Klausler, 1986; Rizos & Spyropoulos, 2004).

No exame histopatológico das fossetas, geralmente observa-se um trato mucoso revestido por epitélio estratificado escamoso, por vezes hiperplásico, contínuo com o epitélio labial. A maioria das células basais do epitélio estratificado está vacuolizada e com núcleo deslocado, lembrando células epiteliais imaturas (Rizos & Spyropoulos, 2004). Acantólise, degeneração hidrópica e espongirose também foram relatadas no epitélio do trajeto mucoso (Rizos & Spyropoulos, 2004). Entre a parede lateral e o fundo do trajeto mucoso, uma pequena região com células colunares paraqueratóticas é observada. As fibras musculares e nervosas não apresentam alterações quanto à quantidade, qualidade e disposição. A porção basal do trato pode conter ácinos de várias glândulas mucosas com pequenos ductos comunicantes. Os ductos podem estar abertos ou fechados. Quando abertos, os ductos podem conter um fluido tipo-mucina. Um processo inflamatório crônico inespecífico superficial associado ao epitélio hiperplásico pode estar presente (Van der Woude, 1954; Souto, 2008). Avaliação radiográfica por sialografia e cintilografia pode ser realizada para identificar fístulas de glândulas salivares menores envolvidas ao lábio inferior ou em outros ductos salivares (Rizos & Spyropoulos, 2004).

Outras características que podem estar associadas à SVW são dentes natais, taurodontismo (Nawa *et al.*, 2008), anquiloglossia, hipoplasia de maxila (Burdick *et al.*, 1987; Kane *et al.*, 2002; Oberoi & Vargervik, 2005), singnatia (adesão entre maxila e mandíbula) (Puvabanditsin *et al.*, 2003), sindactilia, malformação nos pés, externo e coração, otite média com perda da audição (Dissemond *et al.*, 2004; Gatta *et al.*, 2004; Rizos & Spyropoulos, 2004), alterações nas estruturas cerebrais (Nopoulos *et al.*, 2007a) e disfunções cognitivas, principalmente distúrbios de fala e linguagem (Nopoulos *et al.*, 2007b).

A expressividade da SVW é muito variável e os pacientes podem ter desde a completa apresentação com FLP associadas a fossetas e hipodontias até anormalidades pouco detectáveis, como apenas elevações cônicas em lábio inferior. A FL/P ocorre entre 21 a 82% dos casos da SVW (Shprintzen *et al.*, 1980; Schinzel & Klausler, 1986; Menko *et al.*, 1988), sendo que dois terços dessas, são FL ou FLP e um terço FP, similar ao observado nos pacientes com FL/PNS (Schinzel & Klausler, 1986; Rizos & Spyropoulos, 2004). Geralmente, as FL/P associadas a fossetas ocorrem em 17 a 66,2% (Shprintzen *et al.*, 1980; Onofre *et al.*, 1997) dos casos; as fossetas labiais ocorrem em 47 a 88% (Shprintzen *et al.*, 1980; Schinzel & Klausler, 1986) dos pacientes afetados pela SVW, ocorrendo como manifestação única em 64% dos indivíduos acometidos (Schinzel & Klausler, 1986). É previsto que a ocorrência familiar para a SVW seja de 61% dos pacientes, 47% dos quais apresentam fossetas labiais bilateralmente, enquanto 18 e 35% apresentam FL/P e microformas de fossetas labiais (elevação cônica em lábio inferior, fissura labial transversa e depressão mediana), respectivamente (Menko *et al.*, 1988; Onofre *et al.*, 1997).

Observa-se associação significativa entre os tipos de fissuras em pais com SVW e em seus filhos. Pais gravemente afetados tendem a ter filhos também gravemente afetados quando comparados a pais moderadamente afetados (Schinzel & Klausler, 1986; Rizos & Spyropoulos, 2004). Por outro lado, pais não afetados, mas com histórico familiar de deformidades podem apresentar

filhos gravemente afetados. Pais moderadamente afetados também podem apresentar prole gravemente acometida pela SVW (Shprintzen *et al.*, 1980).

Devido a essa grande variabilidade da expressão da SVW, um cuidadoso exame clínico deve ser realizado nos membros disponíveis para avaliação, principalmente em casos esporádicos da síndrome, a fim de confirmar o diagnóstico naqueles apresentando somente manifestações menores e para identificar membros menos afetados quando comparados aos severamente afetados pela SVW (Shprintzen *et al.*, 1980; Schinzel & Klausler, 1986). Menko *et al.* (1988), mostraram que pacientes com FL/P e seus respectivos pais deveriam ter seus lábios inferiores cuidadosamente examinados por causa do risco de as microformas das fossetas serem sub-diagnosticadas, como anteriormente relatado. Além disso, um fonoaudiólogo pode ter um papel muito importante na identificação de pacientes com sinais clínicos mínimos para a SVW, como por exemplo, as fissuras submucosas (Schinzel & Klausler, 1986; Menko *et al.* 1988).

2.3. Características genéticas e moleculares

A SVW é herdada como uma herança autossômica dominante, sendo considerada uma doença com alta penetrância (80 a 100%) e extensa variação na expressividade inter e intra-familiar (Ghassibé *et al.*, 2004; Peyrard *et al.*, 2005; Martelli Junior *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007). Mutações *de novo* (sem história prévia de ocorrência na família) representam 30-50% dos casos de SVW (Conners, 2002).

Embora a SVW seja conhecida há mais de um século, apenas no ano de 2002 o provável gene relacionado à síndrome foi identificado (Kondo *et al.*, 2002). Para esta identificação foi utilizada a análise de associação (*linkage*) genética em um par de gêmeos homocigóticos discordantes para o fenótipo da SVW oriundos de pais não afetados pela condição. A hipótese foi que a única diferença na seqüência genômica entre os gêmeos seria a mutação somática resultante na síndrome. Esta análise mapeou a suposta região crítica para a

síndrome no cromossomo 1q32-41 (SVW1), entre os marcadores D1S205 e D1S491 que representa uma região de 350 mil pares de base. Dentre os vários genes contidos nesta região, uma mutação no exon 4 do gene IRF6 (*interferon regulatory factor 6*) foi identificada no gêmeo afetado, a qual não estava presente no irmão normal ou nos pais. Neste mesmo estudo, outras mutações no gene IRF6 foram identificadas em 45 famílias não-aparentadas afetadas pela SVW (Kondo *et al.*, 2002). A localização do locus e mutações nos pacientes com a SVW foram, também, confirmadas em estudos subseqüentes (Kayano *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Shotelersyk *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Gatta *et al.*, 2004; Ghassibé *et al.*, 2004; Matsuzawa *et al.*, 2004; Item *et al.*, 2005).

Um segundo locus associado à SVW foi mapeado no cromossomo 1p43 (SVW2), sugerindo a possível existência de heterogeneidade genética, contudo o gene alterado ainda não foi identificado (Koillinen *et al.*, 2001). Além disso, um possível locus modificador no cromossomo 17p11.2-p11.1 foi relatado quando uma extensa família brasileira foi analisada (Sertie *et al.*, 1999). Um alelo nessa região poderia aumentar a probabilidade de FP em um indivíduo carregando também um defeito no locus da SVW (Sertie *et al.*, 1999). Vários estudos demonstraram a falta de penetrância nas famílias estudadas com SVW, sugerindo que certas mutações sejam influenciadas por outros fatores, tais como genes modificadores, aspectos ambientais e gênero (Kondo *et al.*, 2002; Matsuzawa *et al.*, 2004; Zuccherro *et al.*, 2004; Srichomthong *et al.*, 2005) Item *et al.*, 2005). É proposto, atualmente, que na maioria das desordens ocasionadas por defeitos em genes únicos, o efeito fenotípico possa resultar da ação combinada de alelos em múltiplos locus, confirmando, assim, a suposta heterogeneidade genética para a SVW (Kondo *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2007b).

Interferons (IFNs) constituem uma família de citocinas multifuncionais que foram originalmente descobertas como mediadores da resposta imune contra infecções virais, mas também regulam o crescimento e diferenciação celular na imunomodulação e no desenvolvimento hematopoético (Mamane *et al.*, 1999; Ben *et al.*, 2005). Os IFNs obtêm seus efeitos através da ativação

transcricional de genes alvos, os quais são regulados pela via de sinalização JAK-STAT e por fatores regulatórios de interferon (IRFs), uma grande família de nove fatores de transcrição (Mamane *et al.*, 1999). Todos IRFs apresentam uma homologia nos primeiros 115 aminoácidos (aa) compreendendo o domínio de ligação ao DNA que contém uma seqüência repetitiva de cinco resíduos de triptofano espaçados por 10 a 18 aa (Eroshkin & Muschegian,1999). Através desse domínio de ligação ao DNA, os membros da família IRFs se ligam ao núcleo de repetição (*motif*) de DNA similar, chamado de elemento de resposta estimulado por IFN (Mamane *et al.*, 1999; Eroshkin & Muschegian,1999). Estruturalmente, a família IRF apresenta homologia com a oncoproteína Myb que, também, caracteriza-se pelo motivo repetitivo de triptofano em seu domínio de ligação ao DNA (Mamane *et al.*, 1999). O membro mais bem reconhecido dessa oncoproteína, c-Myb, regula a diferenciação e proliferação em células linfóides e hematopoiéticas imaturas, no entanto, a relação da família c-Myb com os interferons permanece indefinida (Mamane *et al.*, 1999). De uma maneira geral, IRFs, como o IRF3 e IRF5, são expressos latentemente dentro do citosol em um estado não fosforilado (Bailey *et al.*, 2008a; Bailey *et al.*, 2008b). Sinais de ativação (receptores desencadeantes de cascata como o *Toll-like*) resultam na fosforilação dos IRFs e subsequente translocação nuclear. Para vários IRFs, a fosforilação não somente leva a sua ativação por permitir a dimerização e translocação nuclear, como também promove a sua poliubiquitinização (marcação protéica) e a sua degradação no sistema proteossoma (Bailey *et al.*, 2008b).

O gene da SVW, o IRF6, pertence a essa família de fatores transcricionais, sendo que todos os membros compartilham um domínio de ligação ao DNA do tipo helix-volta-helix altamente conservado e um domínio de ligação à proteína pouco conservada (Eroshkin & Muschegian,1999). Embora os IRFs sejam originalmente conhecidos por regular a expressão de interferon (IFN- α , IFN- γ e IFN- β) após a infecção viral, a exata função do IRF6 não é ainda completamente conhecida (Mamane *et al.*, 1999; Bailey *et al.*, 2008a;

Bailey *et al.*, 2008b). Provavelmente, IRF6 forme dímero antes de se ligar a outros fatores de transcrição e a seus genes alvos no DNA (Mamane *et al.*, 1999; Bailey *et al.*, 2008a; Bailey *et al.*, 2008b). Áreas de ligação do IRF foram encontradas no promotor do gene MSX1 (*muscle segment homeobox 1*), e mutações identificadas nesse gene foram associadas a fissuras orofaciais e hipodontias (Jezewski *et al.*, 2003; Morkuniene *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2007a,b). Além disso, especula-se que IRF6 possa interagir com Smads, uma família de fatores de transcrição que transmite sinalização de TGF- β (fatores de crescimento transformante beta β). Essas observações sugerem que IRF6, MSX1 e TGF- β podem estar envolvidos em uma mesma via de sinalização (Vieira *et al.*, 2007b), ou seja, tanto o MSX1 quanto o TGF- β podem ser genes alvos regulados pelo IRF6, ou serem reguladores da expressão de IRF6 (Morkuniene *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2007b). Sabe-se que os genes IRF6, MSX1 e TGF- β são expressos na mandíbula humana na sexta semana de gestação, e IRF6 e MSX1 expressos na lâmina dentária humana na oitava e meia semana de gestação (Vieira *et al.*, 2007b). Assim, alterações no padrão de expressão desses genes poderiam levar a alterações do desenvolvimento, tais como agenesia dental e fissuras orofaciais (Vieira *et al.*, 2007b).

Análises da expressão do gene IRF6 em camundongos demonstraram elevados níveis de RNA mensageiro ao longo da borda mediana dos processos palatinos durante a fusão do palato, nos germes dentários, folículos capilares, genitália externa e pele (Kondo *et al.*, 2002; Knight *et al.*, 2006). Além disso, IRF6 foi identificado no tecido ectodérmico que recobre os processos labiais e palatinos de camundongos e galinhas (Knight *et al.*, 2006). Recentes estudos indicam que o gene IRF6 exerce um papel importante no controle da proliferação e diferenciação dos queratinócitos (Ingraham *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2006).

Análises histológicas, imuno-histoquímica e molecular de animais deficientes para o gene IRF6 demonstraram uma falta de estratificação do tecido epitelial, caracterizada pelo aumento da sua espessura e pela presença

de queratinócitos alterados na camada supra-basal interrompendo a proliferação e prejudicando a diferenciação celular (Ben *et al.*, 2005; Ingraham *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2006). A camada granulosa e córnea foi ausente, enquanto a camada espinhosa apresentava aumento na sua espessura (Ingraham *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2006) e expressão exacerbada de queratina 14 e p63, ambos marcadores de camada basal que são silenciados durante a parada do ciclo celular e na diferenciação terminal dos queratinócitos descamativos (Bailey *et al.*, 2008b). Adicionalmente, células com acúmulo de grânulos querato-hialinos, indicativos de diferenciação celular, foram ausentes (Ingraham *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2006).

Descobertas recentes das possíveis funções do IRF6, revelam que essa nova proteína codificada pelo gene IRF6, apresenta propriedades inibidoras de crescimento observadas em células epiteliais mamárias através da interação com a proteína maspin (*mammary serine protease inhibitor*), que é um supressor tumoral presente em tecido mamário normal com propriedades anti-invasivas *in vitro* e *in vivo* (Bailey *et al.*, 2005). Além disso, esses achados levam a hipotetizar que maspin e IRF6 funcionem de uma maneira coordenada em promover a diferenciação de células epiteliais mamárias, e que a perda da interação maspin-IRF6 possa promover a transformação neoplásica (Bailey *et al.*, 2008a; Bailey *et al.*, 2008b). Assim, IRF6 parece estar envolvido na regulação do ciclo celular, especialmente por promover a entrada no estado G(0) e devido ao suposto envolvimento na quiescência e diferenciação. As vias que regulam a sua expressão e função podem representar um alvo válido para o diagnóstico e/ou terapêutica do câncer de mama (Bailey *et al.*, 2008b). Até o momento, a expressão do IRF6 tem sido relatada somente em tecidos derivados de epitélio, tais como queratinócitos, epitélio da borda medial da fusão do palato, células epiteliais mamárias e da próstata (Bailey *et al.*, 2008a; Bailey *et al.*, 2008b).

Embora o IRF6 apresente funções distintas dentro da sua família de 9 fatores reguladores de transcrição, tem sido relatado que membros da família

do IRF, IRF5 por exemplo, possuem também funções de supressão tumoral, em parte através de regulação de processos celulares que suprimem o crescimento, tais como a regulação do ciclo celular e a indução de apoptose (Barnes *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2008b).

O gene IRF6 contém, aproximadamente, 19 mil pares de base de comprimento, incluindo 10 exons dos quais do terceiro ao nono são codificantes para o fator de transcrição que apresenta 467 aminoácidos (Au *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2002). Mutações nesse gene foram relatadas em mais de 80 grupos populacionais em diferentes países afetados por SVW, estando espalhadas além dos exons 2 e 9. Contudo, a maioria das mutações afeta o domínio de ligação ao DNA (entre os aa 13-113) ou o domínio de ligação à proteína (entre os aa 226-394) (Eroshkin & Muschegian, 1999). O domínio de ligação ao DNA é a região mais conservada entre os membros da família IRF e é do tipo helix-volta-helix com penta-triptofano na região aminoacil terminal, como anteriormente comentado (Mamane *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2002; Vieira, 2008). Esta região representa parte dos exons 3 e 4 do gene. Através deste domínio os IRFs exercem seus efeitos de ativação da transcrição de genes alvos, incluindo o IFN- α , IFN- γ e IFN- β (Eroshkin & Muschegian, 1999; Au *et al.*, 2001). O domínio de ligação à proteína está localizado na porção carboxil terminal da proteína, entre os exons 7 e 8 (Mamane *et al.*, 1999). IRF6 apresenta neste último domínio uma suposta ligação com as proteínas Smad (ligação SMIR - *Smad-interferon regulatory*), que representam uma família de fatores de transcrição conhecidas por transmitir os sinais de TGF- β (Fitzpatrick *et al.*, 1990). TGF- β exerce papel importante na fusão do palato durante a embriogênese (Fitzpatrick *et al.*, 1990, Kondo *et al.*, 2002).

Mais de 80 mutações diferentes já foram descritas ao longo do gene IRF6 em pacientes com SVW, sendo elas do tipo deleção, inserção ou substituição de nucleotídeos (correspondendo a maioria delas, ~90%), causando mudança na matriz de leitura (mutações missense) ou parada prematura da tradução protéica através da criação de um códon de parada (mutações nonsense)

(Kondo *et al.*, 2002; Ghassibé *et al.*, 2004, Ye *et al.*, 2005; Peyrard *et al.*, 2005). As mutações por mudança de matriz de leitura são mais frequentes que as mutações por criação de códon de parada, destacando a alta prevalência de substituições no nucleotídeo da posição 250 (c.250 C>T) (Peyrard *et al.*, 2005). As mutações na região responsável pela síntese do domínio de ligação ao DNA correspondem a 42% das alterações no gene IRF6, enquanto que as mutações no domínio de ligação à proteína correspondem a 27% (Peyrard *et al.*, 2005).

É proposto que as mutações no domínio de ligação ao DNA resultam em uma alteração estrutural e uma inativação do fator de transcrição (Kondo *et al.*, 2002; Ghassibé *et al.*, 2004). Similarmente, mutações por substituição no domínio de ligação à proteína podem alterar a dimerização do fator de transcrição (Kondo *et al.*, 2002). Os 300 pares de base que codificam o domínio de ligação ao DNA parecem propensos às mutações. Se mutações fossem distribuídas proporcionalmente aos 1401 pares de base no cDNA do IRF6, seriam esperadas 19 mutações. No entanto, estudos detectaram 38 alterações (Peyrard *et al.*, 2005). Além disso, nos 36 pares de base que codificam os primeiros 12 aminoácidos da proteína, sete mutações têm sido descritas, enquanto somente duas seriam esperadas, com a menor parte mutada sendo a porção entre os dois domínios (Peyrard *et al.*, 2005). Outras regiões afetadas pelas mutações compreendem as áreas de splicing, regiões entre os domínios protéicos e áreas não traduzidas, porém transcritas no RNAm do IRF6 (Kayano *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Ghassibé *et al.*, 2004).

Além disso, é possível que mutações no gene IRF6 possam envolver, de forma diferente, domínios funcionais da proteína, além de outros genes modificadores ou polimorfismos contribuindo para as manifestações alteradas da síndrome (Kondo *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2005). É importante salientar que alguns estudos falharam em identificar mutações no gene IRF6 em pacientes com SVW (Kondo *et al.*, 2002; Kayano *et al.*, 2003; Peyrard *et al.*, 2005) e que uma forte associação entre FL/PNS e polimorfismos em nucleotídeo único (SNP) no gene IRF6 tem sido descrita (Zuccherro *et al.*; 2004; Blanton *et al.*,

2005; Scapoli *et al.*, 2005; Srichomthong *et al.*, 2005; Morkuniene *et al.*, 2006). Um dos aspectos instigantes a esclarecer é o real motivo da concomitância de FP isolada e FLP ocorrendo em uma mesma família com SVW, já que a morfogênese desses processos é distinta (Shprintzen *et al.*, 1980; Sertie *et al.*, 1999). No entanto, algumas hipóteses são consideradas: genes modificadores podem estar presentes, ou seja, indivíduos que carregam o gene da SVW estão sujeitos a influências poligênicas contributórias para as FL/P e a fatores ambientais (fumo, álcool, drogas, vitaminas) que podem, também, alterar ou contribuir para a formação das FL/P. Assim, a SVW se torna influenciada por múltiplos fatores (Schinzel & Klausler, 1986; Kondo *et al.*, 2002; Pegelow *et al.*, 2008).

2.4. Tratamento

Vários métodos são propostos para o tratamento das manifestações clínicas da SVW, os quais são dependentes da gravidade das características clínicas associadas (Schinzel & Klausler, 1986; Rizos & Spyropoulos, 2004; Martelli-Júnior *et al.*, 2006a). As FL/P são tratadas cirurgicamente o mais precocemente possível para prevenir o desenvolvimento de problemas funcionais e estéticos, enquanto as fossetas labiais são excisadas posteriormente se o paciente apresentar infecções recorrentes devido à associação com glândulas salivares menores ou se esteticamente não estiver satisfeito (Lopes *et al.*, 1999; Ziai *et al.*, 2005; Brookes & Canady, 2007; Souto, 2008). A remoção das fossetas labiais deve ser apropriadamente conduzida, de modo que todo o seu trajeto seja excisado, evitando, assim, a presença de tecidos glandulares residuais que facilitam a formação de mucocelos (Ziai *et al.*, 2005). Sendo assim, apesar da contribuição na aparência cosmética das fossetas labiais após a excisão cirúrgica, os altos índices de formação de mucocele e o aumento do número dos procedimentos operatórios, além da possibilidade de os resultados cirúrgicos não serem os desejáveis, sugerem

cautela no aconselhamento pré-operatório, considerando-se os riscos e benefícios do procedimento (Brookes & Canady, 2007).

Hipoplasias da maxila e hipodontias apresentam conseqüências clínicas diretas, podendo assim, necessitarem de intervenções cirúrgicas e/ou ortodônticas precocemente (Oberoi & Vargervik, 2005). Embora o preciso padrão esquelético para os pacientes com SVW não seja claro, a deficiência do crescimento facial, como tamanho e altura da maxila, é ainda inferior quando comparado a pacientes com FL/PNS (Kane *et al.*, 2002; Suda *et al.*, 2006).

2.5. Aconselhamento genético

O aconselhamento genético é importante e bastante recomendado (Shprintzen *et al.*, 1980; Rizos & Spyropoulos, 2004; Martelli-Júnior *et al.*, 2006a). No entanto, estabelecer o risco de recorrência para SVW é audacioso, uma vez que a síndrome apresenta penetrância incompleta e expressividade variável, além dos mecanismos genéticos para a doença serem ainda muito imprecisos (Shprintzen *et al.*, 1980; Item *et al.*, 2005). Como é previsto para outras síndromes com herança autossômica dominante, qualquer uma das expressões pode ser herdada, contudo, nenhuma das expressões pode ser visível no fenótipo (Shprintzen *et al.*, 1980). Torna-se prudente, então, fazer a orientação quanto à probabilidade de herança do gene da SVW e não, para o efeito dele. No aconselhamento deve ser discutida a probabilidade de herança do gene (50%), as variadas formas de expressão da síndrome, além de a penetrância ser incompleta, uma vez que gerações podem ser saltadas pelo acometimento da SVW (Shprintzen *et al.*, 1980; Ziai *et al.*, 2005). Pelo fato de a penetrância variar de 80% a 100%, estima-se que as chances de uma criança nascer com o gene mutado e apresentar a doença variem de 40% a 50% (Schinzel & Klausle, 1986; Rizos & Spyropoulos, 2004). Mesmo assim, torna-se prudente que as informações para o aconselhamento não incluam o risco de recorrência para qualquer uma das manifestações (Shprintzen *et al.*, 1980).

2.6. Diagnóstico diferencial

A síndrome pterígio-poplíteo (SPP; MIM #119500) representa a principal anomalia para o diagnóstico diferencial da SVW (Kondo *et al.*, 2002; Ghassibé *et al.*, 2004; Rizos & Spyropoulos, 2004). SPP é uma malformação rara, descrita primeiramente em 1.869 por Trelat, atingindo cerca de 1 a cada 300.000 nativos (Lees *et al.*, 1999). A SPP também é causada por mutações no gene IRF6, compartilhando os mesmos sinais da SVW, porém é uma alteração mais complexa (Lees *et al.*, 1999; Peyrard *et al.*, 2005). Além das características clínicas encontradas na SVW, pacientes afetados pela SPP podem apresentar adesão da membrana poplíteal, anormalidades de membros inferiores e unhas, anquiloglossia e anomalias genitais, incluindo criptorquidismo, escroto bífido e hipoplasia uterina (Lees *et al.*, 1999; Gorlin *et al.*, 2001). Os padrões de desenvolvimento e inteligência são normais (Lees *et al.*, 1999). A SPP é herdada como uma condição autossômica dominante com grande variabilidade na expressão clínica tanto inter quanto intrafamiliar. É necessário o reconhecimento desta alteração para que possa ser incluída no diagnóstico diferencial entre as fendas orofaciais com fossetas labiais e síndromes com pterígea.

Distinção entre SVW e SPP pode ser difícil, e casos com SVW devem ser cautelosamente examinados para excluir anormalidades características da SPP (Lees *et al.*, 1999). Especula-se que alguns casos de SVW podem, de fato, representar variantes moderadas de PPS, já que ambas as síndromes compartilham alterações genéticas semelhantes (Puvabanditsin *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 2008). Curiosamente, relatos recentes demonstram que indivíduos de uma mesma família podem apresentar tanto SVW quanto SPP causados pela mesma mutação no gene IRF6 (Kondo *et al.*, 2002; Ghassibé *et al.*, 2004). Estes achados indicam que a correlação genótipo-fenótipo não é absoluta. Mais estudos clínicos e genéticos são necessários para elucidar melhor a variabilidade fenotípica para cada síndrome (Medeiros *et al.*, 2008). Além disso, tem sido hipotetizado que a haploinsuficiência do IRF6 resulte na

SVW, enquanto as mutações negativo dominantes originam a PPS, no entanto, em vários outros estudos esta correlação não foi verdadeira (Kondo *et al.*, 2002; Item *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2006).

Outras anomalias, apresentando as fossetas labiais e FL/P, que devem ser diferenciadas daquelas vistas na SVW, são: síndrome orofaciodigital tipo I (OFDI; MIM #311200), associadas as fossetas labiais, língua bífida, hipodontias, frênulas, fissuras orofaciais, hipoplasia das cartilagens nasais, malformações renais e das mãos, hipertelorismo e retardo psicomotor (Rizos & Spyropoulos, 2004; Souto, 2008), além da síndrome da maquiagem de Kabuki (KMS; MIM #147920, associada a uma face dismórfica, deficiência mental, anomalias esqueléticas [braquidactilia e alterações vertebrais], retardo do crescimento pós-natal e um padrão dermatoglífico incomum [polpa digital abaulada e alças digitais ulnares]). As fossetas labiais e as FP nessa síndrome são manifestações não muito freqüentes (Dissemond *et al.*, 2004).

Vale ressaltar que as fossetas em comissura labial, geralmente, não estão associadas à FL/P e sim, a fissuras faciais horizontais. Elas ocorrem, normalmente, do mesmo lado da fissura horizontal, podendo representar um defeito embriogênico dessa fissura (Rizos & Spyropoulos, 2004). Já as fossetas em lábio superior são raras (Charrier *et al.*, 2006), embora Item *et al.* (2005) tenham relatado o primeiro caso de SVW associado a fosseta em lábio superior, sugerindo uma nova classificação para SVW.

2.7. Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica (FL/PNS) e *single nucleotide polymorfism* (SNP)

As FL/P ocorrem em aproximadamente 70% dos indivíduos como não sindrômicas, ou seja, sem malformações estruturais nos demais órgãos e sem alterações comportamentais e/ou cognitivas (Gorlin *et al.*, 2001; Jugessur *et al.*, 2008); os demais 30% ocorrem por desordens mendelianas (autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao X), cromossômicas,

teratogênicas e condições esporádicas que incluem defeitos congênitos (Zuccherro *et al.*, 2004).

FL/P desenvolve durante os estágios precoces da embriogênese, sendo a formação dos lábios e do palato temporalmente diferentes. Durante a 4-7^a semana de gestação, o processo medial e lateral nasal se fundem no processo maxilar para formar o palato primário e a parte central do lábio superior e nariz. Durante a 8-12^a semana gestacional, as placas do palato secundário se fusionam para formarem o palato duro e mole. Desta forma, alterações na fusão das proeminências maxilares e nasal média (FL) e/ou das placas palatinas (FP) resultarão nas FL/P (Carinci *et al.*, 2007; Pegelow *et al.*, 2008). Há evidências de que famílias apresentando FP isolada têm aspectos genéticos diferentes em comparação a famílias afetadas por FL isolada. Pacientes com FLP completa pertencem ao grupo das FL. Por essa razão, tem sido convencionalmente decidido classificar as famílias, e pacientes, com FP somente como FP isolada e as famílias restantes (pacientes com FL com ou sem FP) como FL/P. Essa distinção é biologicamente relevante, apresentando fundamentos biológicos e genéticos separados (Carinci *et al.*, 2007).

A fissura labial com ou sem fissura palatina, não sindrômica (FL/PNS) (MIM 119530) representa a anomalia craniofacial congênita mais comum, afetando aproximadamente 1 em cada 500 a 2.000 nativos, dependendo da origem geográfica da população estudada. Estudos revelam que a população asiática, os ancestrais dos nativos americanos e os europeus do norte apresentam uma maior incidência de FL/P (Gorlin *et al.*, 2001; Srichomthong *et al.*, 2005). Em contraste, africanos e descendentes deles apresentam maior incidência de FL somente (Vieira, 2008). No Brasil, os estudos quanto à incidência de FL/P são escassos e variam consideravelmente. De acordo com os levantamentos, a incidência de FL/P e FP varia de 0,19 a 1,46 para cada 1.000 nascimentos (Loffredo *et al.*, 2001; Martelli-Júnior *et al.*, 2006b). Não se sabe se a diferença epidemiológica entre os estudos é real ou devido a diferenças metodológicas (Martelli-Júnior *et al.*, 2006b). Mesmo representando

um defeito congênito comum, a etiologia e a patogênese da FL/P permanecem desconhecidas (Vieira, 2008). Isso representa, em grande parte, o reflexo da complexidade e a diversidade dos mecanismos moleculares envolvidos durante a embriogênese, apresentando tanto fatores genéticos como ambientais uma importante e considerável contribuição (interações complexas gene/gene ou gene/fatores ambientais) (Carinci *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2007a,b; Vieira, 2008). Como fatores ambientais, os principais fatores contribuintes são o tabagismo materno e ingestão deficiente de ácido fólico no período pré-gestacional e no primeiro trimestre de gestação (Vieira, 2008). Quanto à contribuição genética, as mais recentes estimativas sugerem que de 3 a 14 genes contribuam para as FL/P, dentre os quais, destacam-se os genes: MSX1, IRF6, FGF's, TGF- α e TGF- β) (Vieira, 2008).

O gene IRF6 se tornou, inicialmente, alvo de investigações para a sua provável contribuição às FL/P, após mutações serem identificadas em pacientes com SVW (Kondo *et al.*, 2002). Como descrito anteriormente, a SVW apresenta-se clinicamente com FL/P e fossetas em lábio inferior (Schinzel & Klausler, 1986; Souto, 2008). No entanto, 15% dos indivíduos afetados apresentam apenas FL/P isoladas, impossibilitando a distinção entre FL/PNS e SVW (Zuccherro *et al.*, 2004; Carinci *et al.*, 2007; Jugessur *et al.*, 2008). Isso leva a hipotetizar que variações genéticas do IRF6, responsáveis pela SVW, podem também estar envolvidas na etiologia das FL/PNS (Zuccherro *et al.*, 2004). Subseqüentemente, novos estudos sugeriram que variações na seqüência do gene IRF6 são, fortemente, importantes para FL/P em várias populações humanas (Blanton *et al.*, 2005; Ghassibé *et al.*, 2005; Scapoli *et al.*, 2005; Srichomthong *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007a; Suazo *et al.*, 2008). Especula-se que o genótipo GG ligado ao polimorfismo V274I (substituição de uma valina por isoleucina na posição do aminoácido 274, rs 2235371), (820G>A) presente no exon 7 do gene IRF6 esteja fortemente relacionado às FL/P quando comparado aos genótipos GA e AA, e que, ainda, o alelo G tenha um efeito recessivo sobre o alelo A (Srichomthong *et al.*, 2005). Acredita-se que

o alelo A seja um alelo protetor, específico para humanos, que foi selecionado pela evolução humana (Zuccherro *et al.*, 2004; Srichomthong *et al.*, 2005; Pegelow *et al.*, 2008). Essa variação polimórfica no gene IRF6 localiza-se na região do domínio de ligação à proteína Smad (SMIR), o que hipoteticamente poderá alterar a função do gene e contribuir para as prováveis FL/P (Zuccherro *et al.*, 2004; Scapoli *et al.*, 2005; Srichomthong *et al.*, 2005). Além disso, o resíduo valina é fortemente conservado dentro de várias espécies (Zuccherro *et al.*, 2004). Assim, surge uma questão sobre a possibilidade de a variação alélica no locus da SVW poder originar as FL/PNS (Zuccherro *et al.*, 2004; Blanton *et al.*, 2005; Carinci *et al.*, 2007). É importante ressaltar que o gene IRF6 apresenta várias regiões polimórficas descritas, contudo, apenas o polimorfismo indicado acima (rs 2235374) ocorre em região exônica e resulta em mudança de aminoácido, indicando um provável efeito biológico.

3. Proposição

1. Analisar a ocorrência de mutações em 2 famílias brasileiras afetadas pela SVW, através da análise das regiões codificantes do gene IRF6, além das regiões flanqueadoras intrônicas.
2. Correlacionar as mutações identificadas com os fenótipos das 2 famílias brasileiras afetadas pela SVW.
3. Avaliar a frequência do polimorfismo V274I (rs2235371) em brasileiros afetados pela FL/PNS, utilizando como controle indivíduos normais.

4. Materiais e Métodos

4.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos, deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP (processo 068/2007; Anexo).

4.2. Pacientes

4.2.1 Afetados pela síndrome de van der Woude e grupos controle

Este estudo analisou duas famílias (ambas do estado de Minas Gerais, Brasil) afetadas pela SVW, abrangendo tanto membros afetados pela síndrome quanto indivíduos não afetados. A primeira família compreende 54 descendentes diretos, distribuídos nas últimas cinco gerações, com 12 membros afetados pela síndrome (7 homens e 5 mulheres) (Figuras 1 e 2). A análise genética desta família foi realizada em 6 indivíduos afetados e 10 não afetados pela SVW. A segunda família é composta por 19 descendentes diretos, distribuídos entre as últimas quatro gerações, com oito membros afetados (5 homens e 3 mulheres), sendo que para a análise genética, todos os membros foram acessados (Figuras 3 e 4). Todos os pacientes, de ambas as famílias, acessados para a análise genética foram avaliados por, no mínimo, dois profissionais. Como grupo controle foram utilizados 100 indivíduos normais e sem relação com as famílias citadas, com idade entre 19 a 47 anos (72 mulheres e 28 homens). Esse grupo foi formado por alunos cursando o 3º e 4º ano do curso da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP foram convidados a participar por livre e espontânea vontade. Os alunos foram escolhidos por apresentarem facilidade de entendimento e boa condição bucal. Um segundo grupo controle foi formado por indivíduos apresentando FL/PNS diagnosticadas e tratadas no Centro de Reabilitação Pró-Sorriso (Centrinho) da Universidade de Alfenas, Minas Gerais, Brasil, sendo o mesmo local de atendimento dos pacientes da SVW. Esse grupo foi composto por 50 indivíduos,

na faixa etária entre 0 a 61 anos (23 homens e 27 mulheres), sem histórico familiar de síndromes associadas às FL/P ou qualquer outra alteração sistêmica.

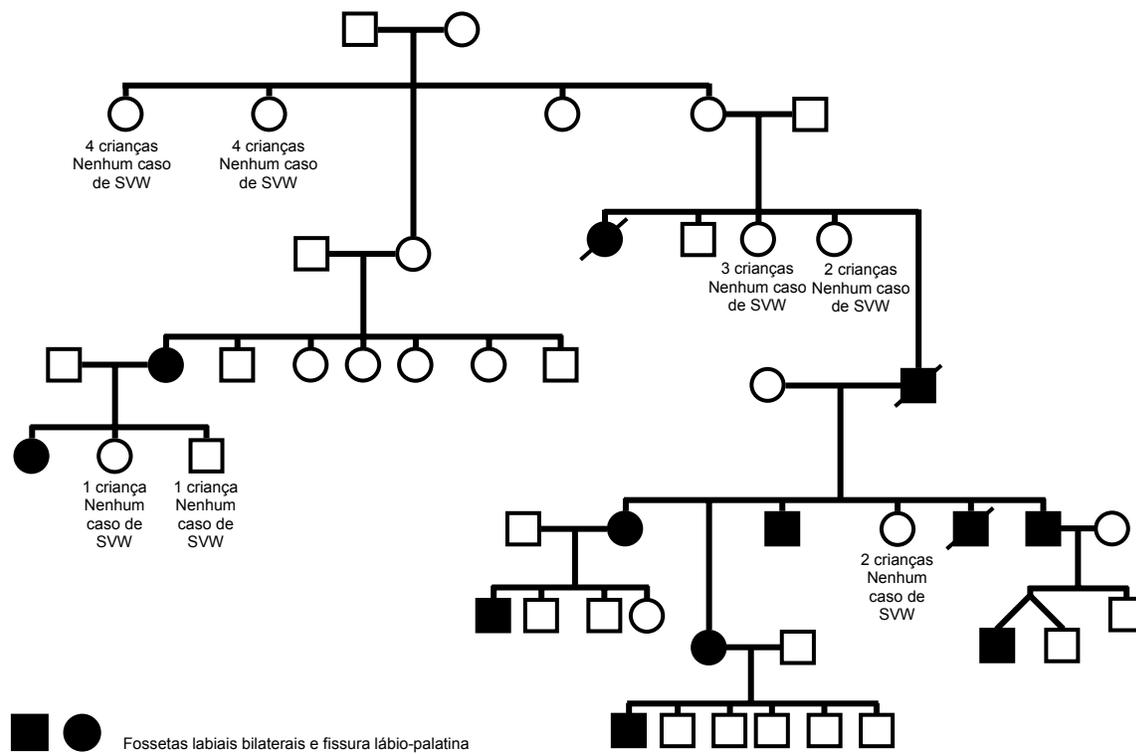


Figura 1 - Heredograma da primeira família deste estudo afetada pela SVW.

Todos os indivíduos afetados apresentam uma combinação de fossetas labiais bilaterais em lábio inferior e fissura lábio-palatina.



Figura 2 - Visão clínica de um membro da família SVW 1. Observam-se fossetas labiais bilaterais e paramedianas em lábio inferior e fissura labial esquerda em lábio superior reparada (A) em associação com fissura palatina, inicialmente, reparada (B).

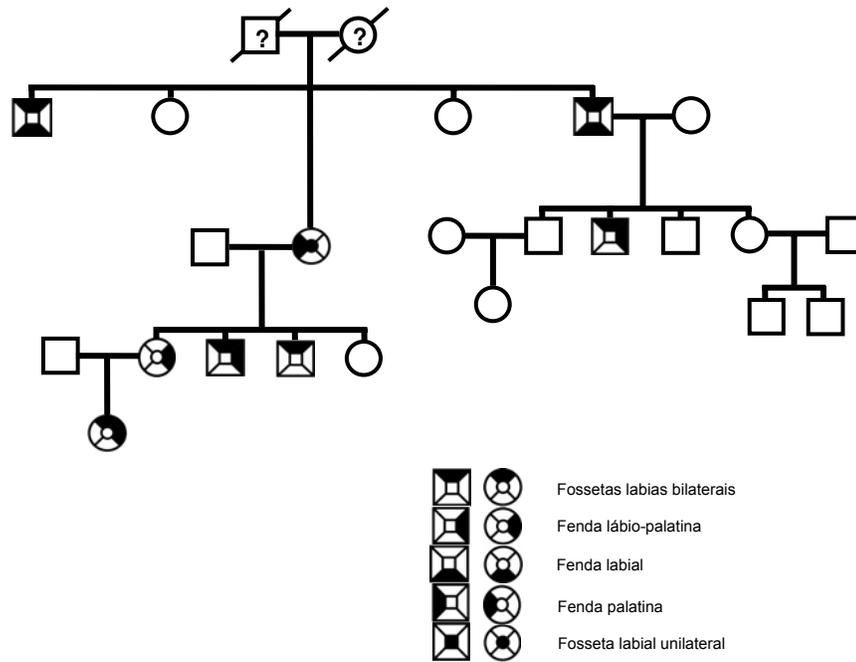


Figura 3 - Segunda família deste estudo afetada pela SVW. Enquanto a penetrância gênica é provavelmente completa, a expressividade é extremamente variada.



Figura 4 - Membros afetados da família SVW 2 apresentando associações clínicas de fossetas labiais e fissuras lábio-palatina. A: Fossetas labiais bilaterais associadas à FLP em um membro da família. B: Aspecto clínico após 2 anos da reparação da fissura no paciente em A. C: Fossetas labiais bilaterais em lábio inferior e FLP bilateral reparada. D: Paciente afetado apresentando FL unilateral reparada e fossetas labiais.

4.2.2. Afetados pela de FL/PNS e grupo controle

As amostras de pacientes com FL/PNS para análise do polimorfismo rs2235371 também foram obtidas no Centro de Reabilitação Pró-Sorriso (Centrinho) da Universidade de Alfenas, Minas Gerais, Brasil, durante o tratamento odontológico oferecido aos indivíduos fissurados. Esse grupo de pacientes com FL/PNS foi complementar ao segundo grupo controle utilizado para confirmar a especificidade das mutações encontradas nas famílias com SVW. O mesmo foi composto por 241 indivíduos, na faixa etária entre 0 a 57anos, dos quais 114 (47,3%) foram homens e 127 (52,7%) mulheres, sem histórico familiar de síndromes associadas às FL/P. Esses pacientes também foram categorizados pelo tipo de fissura, lateralidade, extensão anatômica e cor de pele. Quanto ao tipo de FL/P, 76 (31,5%) apresentaram FL, 118 (49%) FLP e 47 (19,5%) FP. As fissuras ocorreram em 86 (35,7%) casos no lado direito, 65 (27%) casos no lado esquerdo e 44 (18,3%) casos foram bilaterais. Quanto à extensão anatômica, 197 (81,7%) pacientes apresentaram casos completos da malformação e 44 (18,3%) foram acometidos de forma incompleta. A cor de pele mais prevalente no grupo com FL/PNS foi o feoderma (146 indivíduos - 60,6%), seguida pelo leucoderma (70 indivíduos - 29%) e, por fim, a melanoderma (25 indivíduos – 10,4%). A forma esporádica de acometimento ocorreu em 133 (55,2%) pacientes, e a familiar, em 108 (44,8%) indivíduos. Como grupo controle foi utilizado 126 indivíduos clinicamente normais, com idade entre 18 a 59 anos (36 homens e 90 mulheres). Esse grupo também foi complementar ao primeiro grupo controle utilizado para confirmar a

especificidade das mutações encontradas nas famílias com SVW. Os pacientes foram subdivididos quanto à idade e cor de pele, sendo que 104 (82,5%) indivíduos foram leucodermas, 18 (14,3%) feodermas, dois (1,6%) melanodermas e dois (1,6%) xantodermas (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos pacientes do grupo controle (n=126) e do grupo com FL/PNS (n=241).

	Grupo Controle n (%)	Grupo FL/PNS n (%)
Idade		
Media ± DP	25,4 ± 7,7	15,1 ± 13
Variação	18-59anos	11 dias-57anos
Gênero		
Masculino	36 (28,6)	114 (47,3)
Feminino	90 (71,4)	127 (52,7)
Cor de pele		
Leucoderma	104 (82,5)	70 (29,05)
Feoderma	18 (14,3)	146 (60,58)
Melanoderma	2 (1,6)	25 (10,37)
Xantoderma	2 (1,6)	0
Ocorrência familiar		
Esporádico		133(55,18)
Familiar		108 (44,82)
Classificação da fissura		
Fissura labial		76 (31,5)
Fissura lábio-palatina		118 (49)
Fissura palatina		47 (19,5)
Lado envolvido pela fissura		
Direito		86 (44,1)
Esquerdo		65 (33,3)
Bilateral		43 (17,8)
Extensão anatômica		
Completa		197 (81,74)
Incompleta		44 (18,26)

4.3. Obtenção das amostras para análise

Previamente à coleta, todos os pacientes foram informados do propósito do estudo e, então, solicitados a assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido de participação na pesquisa. As amostras de células bucais foram coletadas através de um bochecho, por 60 s, com 5 ml de solução de sacarose a 3%. O conteúdo resultante do bochecho foi transferido para um tubo de 15 ml contendo 3 ml de uma solução 66% alcoólica contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl e 7 mM EDTA, sendo mantido no gelo até o processamento.

4.4. Isolamento do DNA

No laboratório, a cada tubo foi adicionada água Milli-Q autoclavada q.s.p. 15ml. Após centrifugação (3000 rpm por 10 min.) e descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuscitado em solução de lavagem, sem álcool, contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl e 7 mM EDTA, vortexado e centrifugado a 3000 rpm por 5 min. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA. Assim, o tubo foi levado ao banho-maria durante uma hora para, em seguida, serem adicionados 10 µl de proteinase K e incubado a 50°C em movimento contínuo semicircular. Após 16 hs de incubação, foram adicionados 500 µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 12.000 xg a 4°C. O precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol (12.000 xg por 5min), seco e ressuscitado em TE Buffer. A concentração e pureza da amostra foram determinadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm.

4.5. PCR e separação eletroforética

A reação da PCR foi realizada com pares de primers específicos para os nove primeiros exons do gene IRF6, incluindo a região de união exon-intron (Tabela 2). É importante ressaltar que o último exon (exon 10) que compõe IRF6 não é transcrito e foi excluído de nossa análise. Resumidamente, 5 µl de

DNA (500 ng) foram amplificados por PCR em uma reação de 25 µl composta por 0,5 µl de cada primer específico, 2,5 µl de 10x PCR buffer, 1,5 µl de 25 mM MgCl₂, 0,5 µl de 10 mM dNTPmix e 0,25µl de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A condição da PCR para todos os primers, exceto para o primer E5, foi de 15 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 95°C por 20 s, 57°C por 90 s e 65°C por 90 s. Para o primer E5 foi utilizada uma temperatura de anelamento de 65°C ao invés de 57°C como nos outros primers. Os produtos da PCR foram separados eletroforéticamente através de gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo. A documentação foi realizada no sistema de fotodocumentação *Kodak Digital Science™* equipado com câmera digital DC120 e com programa *1D Image Analysis (Kodak)*.

Em experimentos prévios, padronizamos todas as etapas de coleta e isolamento do DNA genômico de amostras salivares de membros do laboratório e ajustamos as condições das reações da PCR para os nove primeiros exons que compõem o gene IRF6. O método de isolamento do DNA genômico de amostras salivares se mostrou muito eficaz e reprodutivo, sendo possível obter concentrações de DNA variando de 3 a 115 µg com uma relação de absorvância 260/280 nm de 1,2-1,6. Mais importante foi que todas as amostras testadas foram passíveis de serem amplificadas e produzirem produtos de PCR com os primers descritos na tabela 1 (Figura 5).

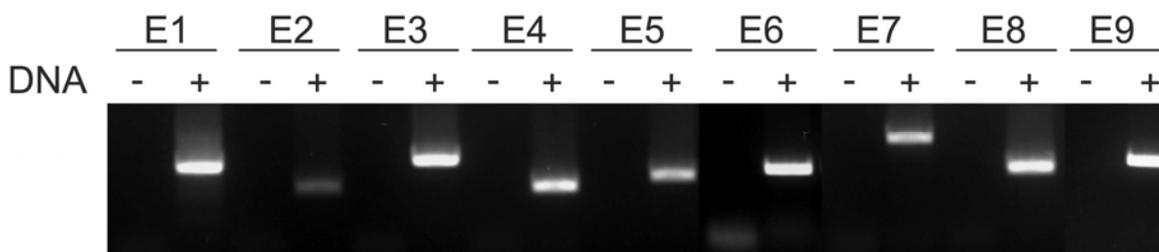


Figura 5 - Amplificação dos exons de IRF6 com DNA genômico isolado de uma amostra salivar. DNA foi isolado como descrito acima e amplificado com os primers específicos para os 9 primeiros exons dos gene IRF6. Seguindo amplificação, os produtos foram separados eletroforéticamente em gel de agarose e corados com brometo de etídeo. Presença e ausência (controle negativo) de DNA são indicadas pelos símbolos + e -, respectivamente. Pares de primers estão indicados no topo da figura.

4.6. Purificação e verificação da concentração do produto de PCR

Após documentação do gel, o produto da PCR foi dele incisado e adequadamente armazenado em um tubo de 1,5 ml. A purificação do produto de PCR contido no gel de agarose foi realizada pelo *Kit Pure Link Quick Gel Extraction (Invitrogen)*, de acordo com as instruções do fabricante. Para a verificação da concentração, uma fração do produto purificado foi submetida à nova separação eletroforética e a intensidade da banda foi comparada a uma amostra padrão de concentração conhecida. Essa densitometria foi realizada no programa *1D Image Analysis (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA)*. O valor da densidade óptica foi calculado levando-se em consideração à área e a intensidade de cada banda.

Tabela 2 - Pares de primers que foram utilizados neste estudo.

Exon	Primer Sense	Primer Antisense	Produto (pb)
E1	AGAAGCGGAGGCGTAGGGTG	ATCTGGAAAAGGGCGACAGG	573
E2	TTATTCTAGGGCTTCTGAGC	AAAGTTATGGAAACAGCAAC	418
E3	GGCTAGAGCATGAAGTGTA	CATGCCCCCAAAGAGGAAT	596
E4	GCTCTGGGCCAATGATAGGAC	AGGCTTTCTTGCTTTATCCA	409
E5	CAGTGAATCTAGGGAGGTCC	TGCTTTCAGGGCAGTGGTGG	461
E6	CAGTGTTTGGTTCTTGTCTA	TTTACTTCTTCCCTGGTGAC	432
E7	AGTGGCCTTCCTGAATGCTG	CTTGACCTCCTCCAGACTAA	686
E8	AAAGATGGTATTTGTTGAGT	GTTTCAGCAAGACTCTAAGG	436
E9	CCTCAGGGCCTCTTTGGTCT	GAAAAGCAAAGTCTGAAGGGTG	516

4.7. Reação de sequenciamento e análise dos dados

A reação de sequenciamento foi realizada com os mesmos primers descritos acima, mas individualizados, isto é, uma reação com o primer sense e outra com o primer antisense. As reações foram realizadas com 5 ng de cada produto da PCR e o *kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE/Amershan)*, de acordo com as instruções do fabricante. Após precipitação do DNA, as amostras foram seqüenciadas no aparelho 3100 *Genetic Analyser (Applied Bio Systems)*. É importante ressaltar que esses experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia Bucal da FOP, porém o sequenciamento ocorreu no laboratório de Biologia Molecular do CENA/ESALQ, o qual está sob a responsabilidade da Dra. Tsai Siu Mui. A análise dos dados foi realizada no programa *BioEdit*, versão disponível gratuitamente na internet.

4.8. Confirmação das mutações identificadas nas famílias com SVW

Após a análise do seqüenciamento genético nos membros das famílias afetadas pela SVW, as mutações foram confirmadas pela análise com enzimas de restrição (PCR-RFLP). Em adição, a especificidade das mutações foi testada

em um grupo de 100 voluntários normais e em um segundo grupo, de 50 pacientes com FL/PNS.

Para a família 1, a mutação 520delG foi confirmada pela incubação dos produtos de PCR gerados com os primers para o exon 6 (conforme descrito no item 4.5) com a enzima de restrição NarI (*New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA*). Seguindo a digestão, os produtos foram avaliados em gel de poliacrilamida 8% contendo brometo de etídeo e documentados pelo sistema de fotodocumentação. A enzima NarI reconhece um sítio de restrição no amplicon de 432-pb, gerando dois fragmentos com 114-pb e 318-pb. Contudo, a deleção do nucleotídeo G, da mutação 520delG, elimina o sítio de restrição reconhecido pela enzima NarI, preservando a digestão do amplicon de 432-pb.

Para a família 2, a mutação 1135 T>A foi confirmada com a enzima de restrição EaeI (*Fermentas Inc., Hanover, MD, USA*). Amostras dos indivíduos da família 2 e indivíduos controle foram amplificadas como descrito acima (item 4.5) com o par de primers para o exon 8 e incubadas com a enzima de restrição EaeI, como recomendado pelo fabricante (*Fermentas Inc.*). Após a incubação, os produtos foram avaliados em gel de poliacrilamida 8% contendo brometo de etídeo. A transversoão T>A abole o sítio de restrição da enzima EaeI, preservando a digestão do amplicon de 436-pb encontrado nos indivíduos mutados. Alelos normais após incubação com EaeI são digeridos em dois fragmentos com 145-pb e 291-pb.

4.9. Análise do efeito das mutações nas famílias com SVW

Os programas de bioinformática BioEdit e PSIPRED (Hall, 1999; McGuffin *et al.*, 2000) foram utilizados para predizer o efeito das mutações identificadas em IRF6 no perfil hidrofóbico e na estrutura secundária da proteína.

4.10. Análise do polimorfismo V274I (820G>A) em indivíduos normais e com FL/PNS

A técnica reação de PCR-RFLP foi utilizada para verificar a ocorrência do polimorfismo rs 2235371 em IRF6 nas amostras de indivíduos normais e de pacientes com FL/PNS. A presença do nucleotídeo polimórfico A (de menor frequência) gera um sítio adicional de restrição reconhecido pela enzima Mbol, enquanto que a presença do nucleotídeo selvagem G (de maior frequência) abole este sítio. Então, amostras de DNA foram amplificadas como descrito acima (item 4.5) com o par de primers para o exon 7 e incubadas com a enzima de restrição Mbol, como recomendado pelo fabricante (*New England Biolabs*). Seguindo a digestão, os produtos foram avaliados em gel de poliacrilamida 8% contendo brometo de etídeo e documentados pelo sistema de fotodocumentação. Na presença do nucleotídeo selvagem, 5 fragmentos foram formados (322, 147, 80, 35 e 33-bp), enquanto que a presença do nucleotídeo polimórfico resultou na digestão do fragmento de 322-bp, gerando 6 bandas (235, 147, 87, 80, 35 e 33-bp) (Figura 6).

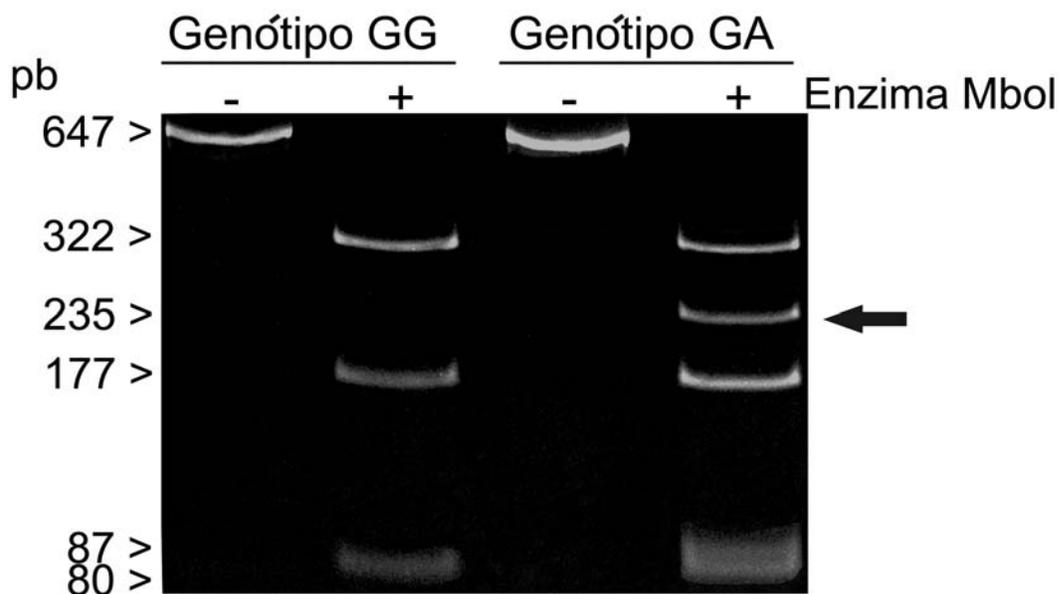


Figura 6 - Perfil eletroforético representativo do ensaio de PCR-FRLP para caracterização do polimorfismo V274I (G820A) no gene IRF6 em uma amostra identificada com o genótipo GG e em outra com o genótipo GA deste estudo. Símbolos (- e +) representam a incubação ou não com a enzima Mbol. A diferenciação entre os genótipos é possível pela presença da banda de 235 pb (indicada pela seta) no genótipo GA.

4.11. Análise estatística

O teste qui-quadrado foi utilizado para comparar a frequência do polimorfismo V274I (820G>A) entre os grupos controle e de pacientes com FL/PNS, e o teste de equilíbrio Hardy-Weinberg foi utilizado para analisar a frequência de distribuição alélica entre os grupos citados acima.

5. Resultados

5.1 Família 1

O heredograma da família 1 foi construído incluindo as últimas cinco gerações. A avaliação clínica dos membros familiares revelou que entre os 54 descendentes (27 homens e 27 mulheres), 12 (22,23%) apresentaram as características clínicas da SVW. Desses 12, a distribuição entre os gêneros foi de 7 (58%) homens e 5 (42%) mulheres. Nenhum dos pacientes apresentou características da PPS, nem mesmo outras alterações sistêmicas ou bucais. Não houve história de cosangüinidade na família. As primeiras duas gerações não apresentaram membros afetados. Na segunda geração, havia dois membros não afetados com descendentes diretos mostrando características típicas da SVW. Já na terceira geração, havia três membros afetados (duas mulheres e um homem), e dessa geração, somente membros afetados transmitiram o traço da SVW para seus descendentes. Da quarta geração, seis membros afetados (três mulheres e três homens) transmitiram seus traços para três dos 16 descendentes. Na quinta geração, houve um caso de gêmeos do gênero masculino, e somente um deles apresentou a SVW. De acordo com essas observações clínicas, há forte evidência de que a síndrome foi transmitida por um gene autossômico dominante com aparente baixa penetrância, por ter tido salto de gerações acometidas. Foi interessante observar que a penetrância foi maior após a terceira geração visto que, aproximadamente, metade dos descendentes foram afetados pela SVW. A manifestação clínica da SVW nos pacientes afetados foi única, com todos os 12 indivíduos mostrando uma associação de fossetas bilaterais paramedianas, simétricas, e FLP completa. Todas as fossetas labiais foram localizadas em vermelhão de lábio inferior.

Após analisar 16 membros da família (10 indivíduos normais e 6 afetados), por sequenciamento genético direto, todos os nove exons amplificados da família 1, identificamos nos membros afetados clinicamente pela SVW uma deleção heterozigótica da base G, na posição do nucleotídeo

520 do cDNA do gene IRF6 (520delG) (Figura 7). Essa nova mutação localizada dentro do exon 6, deletou o primeiro nucleotídeo do aminoácido alanina na posição 174 (Ala174) da seqüência de aminoácidos da cadeia protéica do gene IRF6. Além disso, a mutação resultou na subsequente troca de 49 aminoácidos e uma terminação prematura na posição 223 na cadeia de aminoácidos, abolindo a região carboxil-terminal do IRF6. A quebra da proteína ocasionada pela mutação *frame shift* (alteração na matriz de leitura) levou à abolição do domínio SMIR, presumivelmente importante para a interação com fatores de transcrição do tipo Smad. Dois dos 10 membros não afetados clinicamente pela SVW desta família demonstraram a deleção da base G, sendo considerados “membros carregadores” da mutação. Para confirmar essa alteração genética, realizamos a PCR-RFLP (PCR associada à análise de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática) em todos os membros da família 1 e em todos os indivíduos dos grupos controle. A mutação 520delG elimina o sítio de restrição da enzima *NarI*, preservando a digestão do amplicon de 432-pb resultante da PCR do exon 6. Vale ressaltar que a enzima *NarI* apresenta um sítio de restrição no amplicon de 432-pb gerando, após a incubação, dois fragmentos com tamanhos diferentes: um com 114-pb e outro, com 318-pb nos alelos dos indivíduos normais geneticamente. O DNA amplificado pela PCR e submetidos à incubação com a enzima *NarI* dos indivíduos afetados geneticamente mostraram o fragmento de 432-pb referente ao alelo mutado não digerido e mais dois fragmentos (114-pb e 318-pb) provenientes do alelo normal digerido pela enzima de restrição *NarI*. A análise da enzima de restrição para os pacientes dos grupos controle (indivíduos normais e indivíduos com FLPNS) demonstrou apenas os fragmentos de 114-pb e de 318-pb (Figura 8).

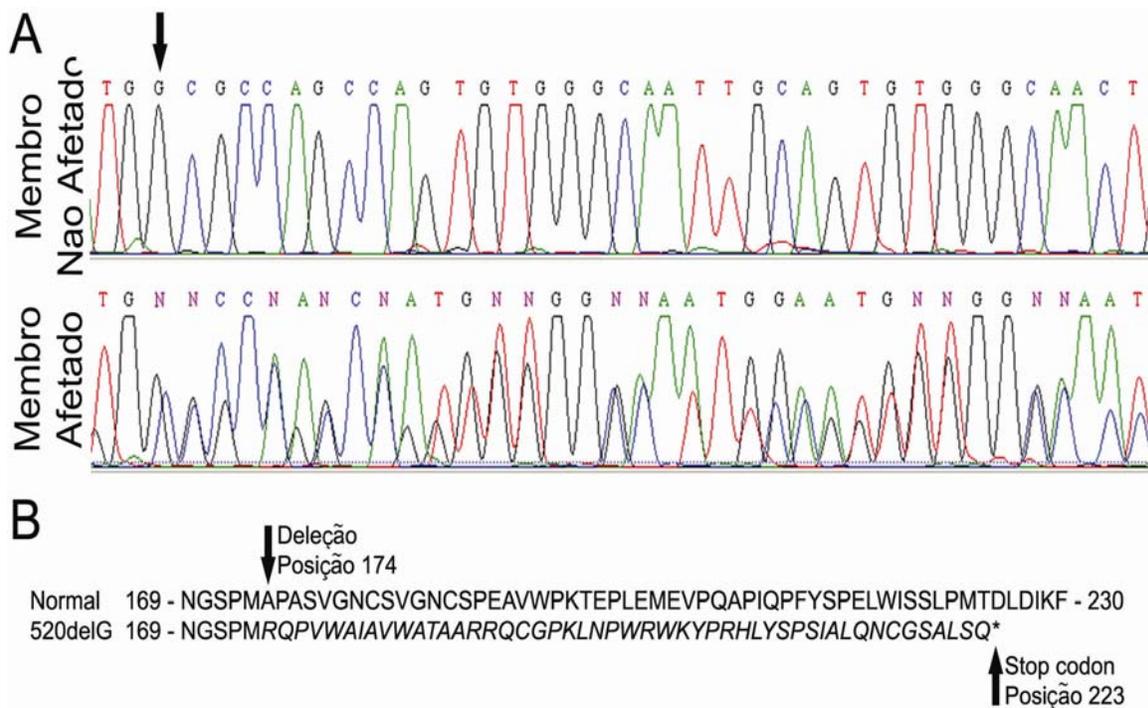


Figura 7 - Identificação de uma nova mutação no gene IRF6 na família SVW 1 deste estudo. (A) Parte de uma seqüência de DNA (cromatograma) de um membro não afetado (topo) e um membro afetado (abaixo) da família 1. A seta indica o nucleotídeo alterado. O membro afetado é heterozigoto para a deleção da base G, na posição do nucleotídeo 520 do cDNA do gene IRF6 (520delG). (B) A porção da seqüência normal de aminoácidos do IRF6 foi alinhada com a seqüência mutada. A nova seqüência criada pela mutação 520delG está indicada em itálico. Esta mutação resultou na subsequente troca de 49 aminoácidos e uma terminação prematura na posição 223 na cadeia de aminoácidos.

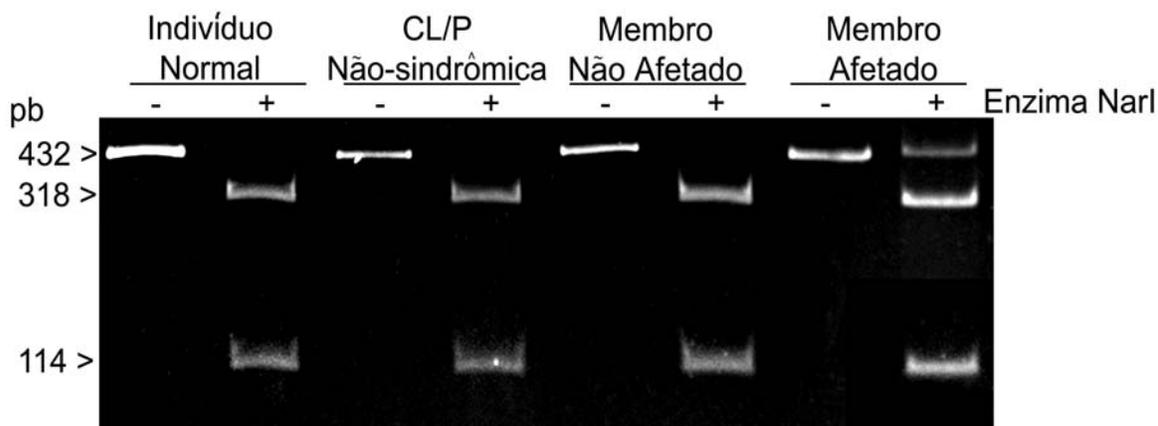


Figura 8 - Análise com a enzima de restrição da nova mutação 520delG. Amostra representativa de 1 indivíduo normal, 1 paciente com FL/PNS, e 2 membros da família 1 (1 membro não afetado e 1 afetado pela mutação). A mutação 520delG elimina o sítio de restrição da enzima *NarI*, preservando a digestão do amplicon de 432-pb, resultante do alelo mutado. O DNA amplificado pela PCR e submetidos à incubação com a enzima *NarI* dos indivíduos afetados geneticamente, mostraram o fragmento de 432-pb em adição a mais dois fragmentos (114-pb e 318-pb) provenientes do alelo normal. A análise do DNA dos indivíduos normais e com FLPNS demonstrou apenas os fragmentos de 114-pb e de 318-pb.

5.2 Família 2

Na família 2, composta por 19 descendentes distribuídos em quatro gerações, as manifestações da SVW foram presentes em 42,1% (5 homens e 3 mulheres) dos indivíduos. Ficamos impossibilitados de examinar as gerações iniciais, e embora a segunda geração tenha afirmado que seus pais eram normais, embora microformas ou formas subclínicas sejam freqüentes. A avaliação sistêmica dos pacientes foi normal, e nenhuma característica da PPS foi observada. Além disso, não havia história de cosangüinidade na família. Todas as quatro gerações tiveram membros afetados, e a transmissão homem

para homem foi presente. A transmissão da SVW nesta família foi consistente com traço autossômico dominante com penetrância, aparentemente, completa. Análise clínica demonstrou que a expressividade da SVW foi variável entre os membros afetados. A manifestação clínica mais freqüente identificada foi uma associação de fossetas bilaterais paramedianas, simétricas, em lábio inferior e FLP completa (3 casos; 33%), seguida de fossetas bilaterais paramedianas, simétricas, e FL completa (2 casos; 22,2%). Fosseta labial unilateral paramediana associada à FP completa, FLP completa isolada, e fossetas labiais paramedianas simétricas foram observadas, sendo cada uma dessas manifestações em um paciente. Interessantemente, fosseta labial foi a manifestação mais comum da doença, sendo observada em 7 dos 8 membros afetados (87,5%), e como apresentação única foi observada em um único paciente (12,5%). Todas as fossetas labiais foram localizadas em vermelhão de lábio inferior.

Na família 2, após avaliar todos os exons amplificados e seqüenciados, identificamos uma transversão heterozigótica de uma base T para A (T>A) na posição do nucleotídeo 1135 do cDNA do gene IRF6 (T1135A) (Figura 9). Essa mutação localizada no exon 8 resultou na substituição de uma aminoácido triptofano para uma arginina referente ao códon 379 (W379R) da cadeia protéica do gene IRF6. O resíduo 379 está localizado dentro do domínio de ligação à proteína, sendo o mesmo altamente conservado entre os genes ortólogos do IRF6. Um membro não afetado clinicamente pela SVW demonstrou a mutação identificada. Uma vez que a transversão T>A abole o sítio de restrição da enzima EaeI no exon 8, nós confirmamos a mutação missense (1135T>A) utilizando a incubação do produto da PCR diretamente com a enzima EaeI. O produto da PCR do exon 8 dos membros não afetados da família 2, indivíduos normais e com FL/PNS (grupos controle), quando incubados com a enzima EaeI produziam dois fragmentos (145-pb e 291-pb). No entanto, a incubação enzimática com os produtos de PCR dos membros afetados da família resultaram em três fragmentos [um fragmento não digerido,

originado do amplicon mutado (436-pb) e dois fragmentos digeridos (145-pb e 291-pb)], confirmando a identificação da mutação (Figura 10).

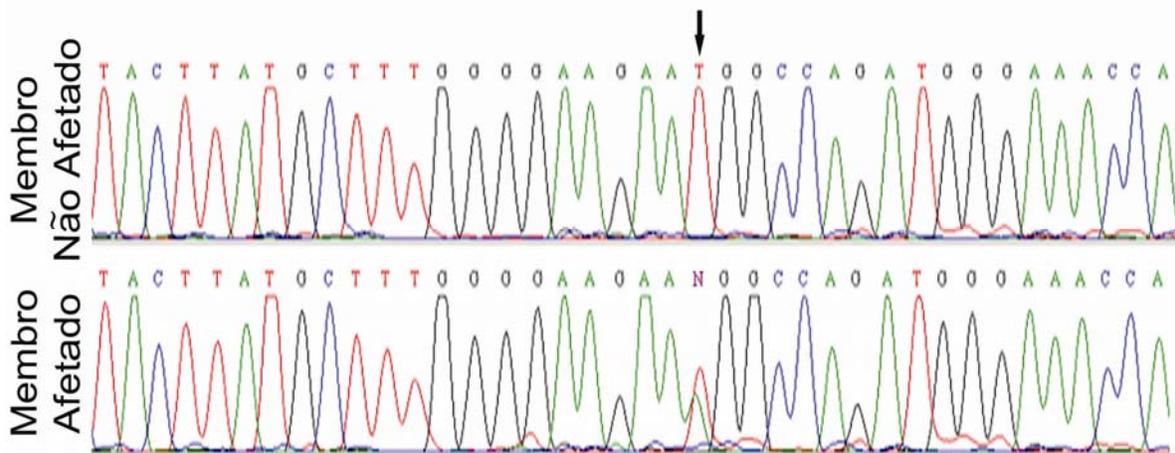


Figura 9 - Seqüência de DNA (cromatograma) evidenciando a mutação identificada no IRF6 em pacientes com SVW, família 2. O topo do cromatograma representa uma parte do exon 8 do gene IRF6 em um membro não afetado. O resultado de um membro afetado pela SVW é demonstrado na parte inferior do cromatograma. Os pacientes afetados geneticamente pela mutação apresentaram uma transversão heterozigótica de uma base T para A (T>A) na posição do nucleotídeo 1135 do cDNA do gene IRF6 (seta), causando a substituição do aminoácido triptofano para a arginina (W379R).

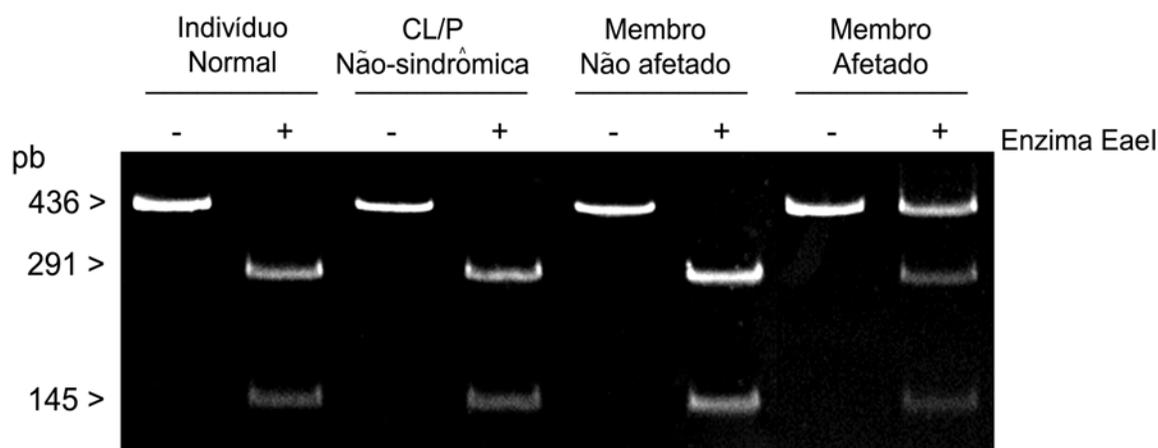


Figure 10 - Análise com enzima de restrição da mutação T1135A. Amostras representativas de 1 indivíduo normal, 1 com FL/PNS, e 2 membros da família 2 (1 membro não afetado e 1 afetado), incubadas com a enzima EaeI. Digestão do produto de PCR dos membros afetados da família resultou em 3 fragmentos: 1 fragmento não digerido, 436pb e 2 digeridos, 291 e 145pb, confirmando a mutação heterozigótica T1135A.

5.3. Tratamento das famílias SVW e dos pacientes com FLP/NS

O tratamento dos pacientes de ambas as famílias afetadas pela SVW e dos afetados pela FLP/NS ainda ocorre no Centro de Reabilitação Pró-Sorriso (Centrinho) da Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas), Alfenas, Minas Gerais; e inclui todas as necessidades cirúrgicas e procedimentos multi/interdisciplinares para a correção das alterações provenientes das manifestações clínicas da síndrome e da própria FL/P (Martelli-Júnior *et al.*, 2006a; Paranaíba *et al.*, 2009).

Queiloplastia de FL unilateral ou bilateral foi realizada pelas técnicas de Spina e Millard ou pela técnica de Millard, respectivamente (Franco *et al.*, 2003). Palatoplastia foi realizada por várias técnicas, incluindo Veau,

Langenbeck, Wardill-Kilner, e Furlow, dependendo de cada caso especificamente (Burdick *et al.*, 1987; Franco *et al.*, 2003). Os pacientes são avaliados e acompanhados por uma equipe multiprofissional composta de fonoaudiólogo, psicólogo, cirurgião-dentista e fisioterapeuta, durante todo o tratamento e estão sob periódicas avaliações para monitorar a oclusão dental, e o tratamento ortognático é realizado quando indicado. Entre os pacientes do presente estudo não houve solicitação de remoção das fossetas labiais, devido à ausência de comprometimento funcional e/ou estético.

5.4. Polimorfismo V274I (820G>A)

O genótipo GA (um alelo contendo o nucleotídeo G na posição 820 e o outro contendo o nucleotídeo A), resultando no polimorfismo protéico V274I, na população brasileira estudada, independentemente da presença de fissura, foi identificado em 36 (9,8%) indivíduos (16 homens e 20 mulheres), dos quais 12 (30,5%) foram leucoderma, 23 (63,9%) feoderma, 1 (2,8%) melanoderma e 1 (2,8%) xantoderma. Este genótipo polimórfico foi identificado em 23 (9,5%) pacientes com FL/PNS, sendo 12 homens e 11 mulheres. Destes, 3 indivíduos (13%) foram leucodermas, 19 (82,6%) feodermas e 1 (4,4%) melanoderma. Quanto à ocorrência familiar, 14 (60,9%) foram esporádicos e 9 (39,1%) foram familiar. Quanto ao tipo de fissura, 5 (21,7%) pacientes apresentaram FL, 14 (60,9%) FLP e 4 (17,4%) FP. Dos 19 indivíduos com fissura labial ou lábio-palatina, 10 (43,5%) apresentaram envolvimento do lado esquerdo, 6 (26,1%) do lado direito e 3 (13%) apresentaram acometimento bilateral. O lado esquerdo (10 pacientes – 43,5%) foi o mais prevalente entre os indivíduos com o genótipo GA. Quanto à extensão anatômica das fissuras, 16 (69,6%) indivíduos apresentaram a forma completa de fissura e 7 (30,4%) a forma incompleta. No grupo controle, o genótipo GA foi identificado em 13 (10,3%) indivíduos (4 homens e 9 mulheres), dos quais 8 (61,5%) foram leucoderma, 4 (30,8%) feoderma e 1 (7,7%) xantoderma (Tabelas 3, 4 e 5).

Não houve diferença na ocorrência do polimorfismo V274I do gene IRF6 entre os 2 grupos analisados. No entanto, houve uma diferença estatisticamente significativa em relação à cor de pele entre os 2 grupos deste estudo ($p=0,0000001$), visto que os leucodermas foram mais prevalentes no grupo controle e os feodermas foram os mais prevalentes no grupo de FL/PNS. Contudo, cor de pele não foi significativamente associada com a presença do alelo polimórfico nos grupos analisados no presente estudo.

De acordo com o teste de equilíbrio Hardy-Weinberg, a frequência alélica esperada em ambos os grupos, controle e FL/PNS, foi normal (Tabela 4).

Tabela 3 - Frequência do polimorfismo G820A do gene IRF6 nos grupos controle e com FL/PNS.

Genótipo	Grupo FL/PNS				
	Grupo Controle	Total	FL	FLP	FP
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Total	126	241	76	118	47
GG	113 (89.7)	218 (90.5)	71 (93.42)	104 (88.13)	43 (91.49)
GA	13 (10.3)	23 (9.5)	5 (5.58)	14 (11.87)	4 (8.51)
AA	0	0	0	0	0
		$\chi^2=0.05, p=0,81$	$\chi^2=0.81, p=0,36$	$\chi^2=0.14, p=0,70$	$\chi^2=0.12, p=0,72$

FL/PNS: Fissura labial e /ou palatina não-sindrômica, FL: Fissura labial, FLP: Fissura lábio-palatina, FP: Fissura palatina.

Tabela 4 – Distribuição alélica e teste de equilíbrio Hardy-Weinberg no grupo controle e com FL/PNS.

	Grupo Controle	Grupo FL/PNS			
		Total	FL	FLP	FP
Alelo	n (%)				
Total	252	482	152	236	94
G	239 (94.8)	459 (95.2)	147 (96.71)	222 (94.06)	90 (95.74)
A	13 (5.2)	23 (4.8)	5 (3,29)	14 (5.94)	4 (4.26)
	$\chi^2=0.37, p=0,54$	$\chi^2=0.61, p=0,43$	$\chi^2=0.95, p=0,32$	$\chi^2=1.04, p=0,31$	$\chi^2=0.17, p=0,67$

FL/PNS: Fissura labial e /ou palatina não-sindrômica, FL: Fissura labial; FL/P: Fissura labial e/ou fissura palatina; FP: Fissura palatina.

Tabela 5 - Características dos pacientes do grupo controle (n=13) e do grupo com FL/PNS (n=23) com o polimorfismo V274I.

	Grupo Controle	Grupo FL/PNS
	n (%)	n (%)
Idade		
Media ± DP	25,5± 8,3	15,5 ± 12,25
Variação	18-59 anos	17 dias-43 anos
Gênero		
Masculino	4 (30,8)	11 (47,8)
Feminino	9 (69,2)	12 (52,2)
Cor de pele		
Leucoderma	8 (61,5)	3 (13)
Feoderma	4 (30,8)	19 (82,6)
Melanoderma	0	1 (4,4)
Xantoderma	1 (7,7)	0
Ocorrência familiar		
Esporádico		9 (39,1)
Familiar		14 (60,9)
Classificação da fissura		
Fissura labial		5 (21,7)
Fissura lábio-palatina		14 (60,9)
Fissura palatina		4 (17,4)
Lado envolvido pela fissura		
Direito		10 (43,5)
Esquerdo		3 (13)
Bilateral		6 (26,1)
Extensão anatômica		
Completa		16 (69,6)
Incompleta		7 (30,9)

6. Discussão

As duas famílias brasileiras avaliadas com SVW evidenciaram manifestações distintas da doença, em que a transmissão ocorreu como um traço autossômico dominante. Não houve histórico de consangüinidade em nenhuma das famílias que sugerisse uma herança autossômica recessiva. Penetrância na SVW é descrita como alta, variando de 80% a 100% (Rizos & Spyropoulos, 2004). Na família 2, pela avaliação clínica do heredograma, a penetrância pareceu ser completa, enquanto na família 1, pareceu ser incompleta por ter tido as duas gerações iniciais sem indivíduos afetados, ou seja, houve “pulo ou salto” de gerações. Embora alguns estudos descrevessem que a discreta ou incompleta penetrância seja devido ao não reconhecimento de microformas ou formas subclínicas da síndrome (Menko *et al.*, 1988; Onofre *et al.*, 1997), todos os pacientes disponíveis foram examinados por, no mínimo, dois profissionais. Em concomitância com estudos prévios (Burdick *et al.* 1987; Rizos & Spyropoulos, 2004, Huang *et al.*, 2007), nenhuma diferença significativa entre gêneros foi identificada em ambas as famílias.

Variações inter e intrafamiliar foram identificadas nas manifestações clínicas dos membros afetados de ambas as famílias. Enquanto todos os membros afetados da família 1 mostraram uma única associação de fossetas labiais bilaterais paramedianas, simétricas e FLP, o que representa um padrão ainda não relatado na literatura; a família 2, apresentou membros com uma grande variação fenotípica. As FL/P ocorreram em sete (87,5%) dos oito indivíduos afetados pela SVW 2 e as fossetas labiais apareceram como manifestação única em apenas um (12,5%) indivíduo. Quanto à distribuição das FL/P, seis (75%) dos sete indivíduos apresentaram FLP (FL ou FL/P), enquanto que um (25%), a FP. Além disso, as fossetas labiais foram presentes em sete (87,5%) dos oito casos de SVW. Quanto às associações das manifestações clínicas presentes na família 2, observou-se que as FL/P associadas a fossetas ocorreram em seis (75%) pacientes. De acordo com a literatura, geralmente, as FL/P ocorrem entre 21 a 82% dos casos da SVW (Shprintzen *et al.*, 1980;

Menko *et al.*, 1988; Shotelersuk *et al.*, 2003), sendo que dois terços dessas são FL ou FLP, e um terço, FP, similar ao observado nos pacientes avaliados da família 2. Nossos achados também corroboram a literatura quanto à prevalência das fossetas labiais, que são identificadas entre 47 a 88% dos casos (Schinzel & Klausler, 1986). No entanto, os achados são discordantes quanto à prevalência da manifestação única das fossetas labiais, pois a literatura refere uma prevalência de 64% (Schinzel & Klausler, 1986) em geral, e, em nosso resultado, observamos de 12,5% dos casos.

Dos sete pacientes da família 2 que apresentaram as fossetas labiais, seis (86%) eram paramedianas e simétricas, apenas um paciente (14%) apresentou a forma unilateral paramediana. Um estudo de 133 pacientes com SVW selecionados em um centro de deformidades craniofaciais no Brasil (Onofre *et al.*, 1997) mostrou que fossetas bilaterais simétricas ocorreram em 49,7% dos pacientes, fossetas bilaterais assimétricas em 31,6%, microformas em 14,3%, medianas em 3,7% e unilateral em 0,7% dos casos. Em outro estudo avaliando 64 pacientes afetados pela SVW, 59 (92%) apresentaram fossetas em lábio inferior, dos quais 45 (76,3%) tiveram a forma simétrica e 12 (18,8%) a forma assimétrica em termos de tamanho, forma e localização (Huang *et al.*, 2007). A distribuição dessas características é muito variável na literatura. Já na família 1, todas as fossetas foram bilaterais e simétricas, o que não é apresentando na literatura.

Outras manifestações da SVW, incluindo dentes natais, hipodontias, taurodontismo (Nawa *et al.*, 2008), anquiloglossia, singnatia (adesão entre maxila e mandíbula) (Puvabanditsin *et al.*, 2003), sindactilia, malformação nos pés, externo e coração, otite média com perda da audição (Dissemond *et al.*, 2004; Rizos & Spyropoulos, 2004), alterações nas estruturas cerebrais (Nopoulos *et al.*, 2007a) e disfunções cognitivas, principalmente distúrbios de fala e linguagem (Nopoulos *et al.*, 2007b) não foram identificadas nos membros de ambas as famílias. A associação de fossetas labiais com FL/P pode ocorrer na PPS (Kondo *et al.*, 2002; Ghassibé *et al.*, 2004; Peyrard *et al.*, 2005).

Distinção, principalmente, entre essas duas síndromes é essencial devido às significativas diferenças no tratamento e no prognóstico. Todas as características da SVW podem ser encontradas na PPS, além do que tais síndromes são alélicas. PPS é uma alteração autossômica dominante caracterizada por fossetas em lábio inferior, membrana popliteal, FL/P, sindactilia e anormalidades genitais (Lacombe *et al.*, 1995; Lees *et al.*, 1999).

Desde 2002, quando Kondo *et al.* identificaram mutações no gene IRF6 em famílias afetadas pela SVW, mais de 80 mutações diferentes já foram relatadas em pacientes afetados pela síndrome. A grande maioria delas é do tipo missense, sendo decorrentes de uma única substituição de um nucleotídeo, localizando-se, principalmente, no domínio de ligação ao DNA ou no domínio de ligação à proteína (domínio SMIR) dentro do IRF6 (Kondo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Peyrard *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2005). Provavelmente, mutações nessas regiões afetam a função regulatória da proteína do IRF6 alterando o controle transcricional dos genes alvos subsequentes (Ingraham *et al.*, 2006). A mutação identificada na família 1 (520delG) não foi localizada no domínio de ligação ao DNA e nem no domínio SMIR do gene IRF6. No entanto, a deleção do nucleotídeo causou uma alteração no padrão de leitura do códon, introduzindo uma terminação prematura no exon 7 e resultando na falta do domínio SMIR pela interrupção da proteína. Embora a precisa função do IRF6 ainda seja incerta, a falta do domínio SMIR inibe a interação com fatores de transcrição Smad, que são bem conhecidos na transmissão dos sinais de TGF- β , os quais apresentam uma função na formação e fusão do lábio e palato (Richardson *et al.*, 2006; Knight *et al.*, 2006). Em IRF3 e IRF7, ortólogos do IRF6, a ligação de Smad com o domínio SMIR é necessária a fim de promover interações com outros fatores de transcrição para regulação de genes alvos (Au *et al.*, 2001). Especula-se que o domínio SMIR também tenha participação na dimerização da proteína IRF6 (Au *et al.*, 2001).

A substituição do aminoácido Arginina para Triptofano (W379R) observada nos membros afetados da família 2 ocorreu no domínio SMIR. Esse

resíduo Triptofano na posição 379 da cadeia protéica é conservado em todos os nove membros da família IRF. Ao redor desse aminoácido, outras substituições, incluindo Fenilalanina para Serina na posição 369 (F369S), Cisteína para Tirosina na posição 374 (C374Y), e Lisina para Glutamina na posição 388 (K388E) já foram identificadas em famílias afetadas pela SVW (Kondo *et al.*, 2002; Peyrard *et al.*, 2005; Matsuzawa *et al.*, 2006). Além disso, nesse mesmo resíduo Triptofano, Wang *et al.* (2003) relataram uma transição de nucleotídeo de TGG para TGA, resultando em um stop códon prematuro (p. W379X). Através da análise de bioinformática (análise da estrutura protéica pela bioinformática) (Hall, 1999; McGuffin *et al.*, 2000), observamos que a substituição do aminoácido triptofano para arginina resultou na alteração do perfil hidrofóbico da proteína e uma quebra da sua estrutura secundária, sugerindo uma possível alteração no efeito biológico da atividade biológica do IRF6. De acordo com os nossos resultados, os achados demonstraram que as mutações identificadas nas duas famílias brasileiras com SVW resultando na alteração do domínio SMIR, são etiológicas para a síndrome, uma vez que as mesmas mutações não foram identificadas em 100 indivíduos normais saudáveis como grupo controle 1, e em 100 pacientes com FL/P isolada como grupo controle 2.

Como foi relatado anteriormente, a análise clínica do heredograma da família 1 sugeriu uma baixa penetrância, o que foi confirmada pela análise genética. Os resultados da análise evidenciaram que dois membros não afetados da família apresentaram a mesma mutação observada nos pacientes afetados fenotipicamente pela SVW. Interessantemente, um desses “carregadores” da mutação é irmão de um gêmeo afetado pela síndrome, e o outro “carregador” tem a mãe e um irmão, dentro de cinco irmãos, afetados geneticamente e fenotipicamente pela SVW. Na família 2, apenas um membro com nenhum sinal da SVW foi carregador da mutação. Esse resultado implica na penetrância incompleta da mutação T1135A, contrastando com a análise clínica do heredograma. Embora alguns estudos afirmassem que a baixa penetrância seja devido à falta de reconhecimento de pacientes com

microformas ou formas subclínicas da doença (Menko *et al.*, 1988; Onofre *et al.*, 1997), neste estudo, conforme já foi informado, os pacientes disponíveis foram examinados cuidadosamente.

Comparando as duas mutações, a mutação 520delG resultou em uma proteína truncada e em um fenótipo homogêneo e mais grave, sugerindo, assim, que a falta do domínio SMIR, provavelmente, prejudica ou abole a função da proteína. No entanto, uma única substituição de um nucleotídeo dentro do domínio SMIR, conforme identificado na mutação T1135A, embora resulte em uma proteína com tamanho normal, sob influência de fatores estocásticos ou genes modificadores, produziu uma proteína com funções imprecisas, resultando em uma evidente variação fenotípica. Os mecanismos responsáveis pela penetrância e expressividade incluem a influência de alelos, genes modificadores, gênero e fatores ambientais (Van Heyningen & Yeyati, 2004). Assim, a SVW está sob variações genéticas e ambientais (Kondo *et al.*, 2002). Tem se tornado cada vez mais evidente que há muitas variantes alélicas ao longo de todo o genoma e que nem todas são variantes codificantes. Alterações no controle transcricional devido a diferenças em promotores ou acentuadores estão cada vez mais emergentes (Yan *et al.*, 2002; Pastinen *et al.*, 2004). Além disso, a expressão gênica está claramente sujeita ao controle epigenético complexo (Wolffe & Matzke, 1999), e as pesquisas genéticas estão ainda iniciando o entendimento dos processos envolvidos na modulação da estrutura da cromatina (Dellino *et al.*, 2004). Variações ambientais têm uma importante contribuição na modulação de todos os aspectos da expressão gênica, particularmente em FL/P (Vieira, 2008), mas as respostas individuais aos fatores ambientais estão sob um controle genético parcial. Cada mutação observada em cada indivíduo é única no contexto fisiológico, genômico, ambiental e espaço-temporal.

Vários métodos têm sido descritos para tratamento da SVW, sendo dependentes da gravidade das manifestações associadas. As FL/P devem ser tratadas tão logo quanto possível, enquanto as fossetas labiais são excisadas

posteriormente caso o paciente apresente infecções recorrentes em lábio inferior devido à associação com glândulas salivares menores; ou ainda, se a estética não esteja agradável para o paciente (Dissemond *et al.*, 2004; Ziai *et al.*, 2005). Vale ressaltar que, devido aos altos índices de formação de mucocele e ao aumento do número dos atos operatórios, além da possibilidade de os resultados cirúrgicos não serem os desejáveis, deve haver cautela no aconselhamento pré-operatório, considerando-se os riscos e benefícios do procedimento (Brookes & Canady; 2007). O aconselhamento genético é um importante contexto e é bem recomendado para as famílias afetadas pela SVW. Um histórico completo familiar e uma diferenciação completa entre SVW e outras síndromes relacionadas são essenciais antes de o aconselhamento ser dado aos membros da família. Informações referentes ao padrão de transmissão do gene, possibilidades de expressão e penetrância e consequência dos fenótipos devem ser enfatizadas. Para as duas famílias, o devido aconselhamento genético foi realizado a todos os membros interessados.

Em relação à análise do polimorfismo V274I (820G>A), tem sido observado que o alelo 820G (274V) representa uma variante comum nas populações estudadas e a variante 820A (274I) é rara, sendo esta última, indicada como um potencial modificador para as FL/PNS (Kondo *et al.*, 2002; Zuccherro *et al.*, 2004). Os resultados de testes de desequilíbrio de transmissão revelam uma significativa transmissão do alelo 820G (274V) em várias populações com FL/PNS, principalmente asiáticos e sul americanos, incluindo o Brasil, sugerindo assim, uma alelo de risco para as FL/PNS (Zuccherro *et al.*, 2004; Srichomthong *et al.*, 2005; Morkuniene *et al.*, 2006). Por outro lado, a frequência encontrada do genótipo GG (274V) foi próxima a 100% em indivíduos africanos e descendentes paquistaneses e lituanos (Zuccherro *et al.*, 2004; Scapoli *et al.*, 2005; Morkuniene *et al.*, 2006); entre 90 - 100% em europeus (caucasianos) (Zuccherro *et al.*, 2004); em 74% na população chilena (Suazo *et al.*, 2008); entre 58-69% em chineses, japoneses (leste da Ásia)

(Zuccherro *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2009) e tailandeses (Srichomthong *et al.*, 2005); e em 44,8% na população sul americana (Brasil, Colômbia e outros países latino-americanos).

A frequência do genótipo GG (274V) na população do presente estudo foi de 90,5% no grupo de FL/PNS e de 89,7% no grupo de indivíduos normais e saudáveis, representando cerca de 90,2% da população investigada independentemente da FL/PNS, o que é comparável com à frequência dos caucasianos (europeus) (Zuccherro *et al.*, 2004). No entanto, não houve diferença estatisticamente importante entre os dois grupos analisados, sugerindo que o polimorfismo V274I não é um fator etiológico isolado para o desenvolvimento das FL/PNS na população brasileira avaliada. No estudo de Zuccherro *et al.* (2004), a frequência do genótipo GG na população sul americana, incluindo o Brasil, foi menor (44,8%) que a encontrada em nossa investigação (90,5%). No entanto, o trabalho referido não especifica a localidade ou região de coleta das amostras, o que poderia justificar tal diferença, já que o Brasil e os países sul americanos representam grupos com diferentes origens ancestrais, tais como africanos, índios e europeus (Zuccherro *et al.*, 2004).

Observou-se diferença estatisticamente significativa, entre os grupos analisados, em relação à cor de pele, visto que os leucodermas foram mais prevalentes no grupo controle e os feodermas foram os mais prevalentes no grupo de FL/PNS. Contudo, cor de pele não foi significativamente associada com a presença do alelo polimórfico. Uma provável explicação para o fato pode ser a diferença de localidade durante a coleta das amostras de saliva, o que levou a formação dos grupos analisados a terem a cor de pele prevalente, diferente. Para o grupo de FL/PNS, a coleta do material biológico ocorreu no Centro de Reabilitação Pró-Sorriso (Centrinho) de Alfenas, Minas Gerais; e para o grupo controle, a Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, São Paulo, foi o local de coleta, sendo que os alunos cursando a graduação em Odontologia é que foram os voluntários. Assim, especulamos que seja

necessária a construção de um novo grupo controle contendo pacientes apresentando a cor de pele semelhante à dos pacientes do grupo FL/PNS, ou seja, feoderma.

Vale ressaltar ainda que a susceptibilidade das fissuras orofaciais na América do Sul está relacionada à ancestralidade ameríndia (americanos e índios), o que pode representar uma frequência maior do que nas demais populações miscigenadas (caucasiana e africana), que compõem a diversidade racial do atual mix sul-americano (Vieira *et al.*, 2002). As FL/PNS têm uma incidência de 1.1/1000 nascidos vivos na América do Sul (Vieira *et al.*, 2002; Suazo *et al.*, 2008) e a raça é uma variável demográfica que tem sido consistentemente associada à frequência das FL/PNS. A maior frequência é observada em índios norte-americanos (3.6/1000 nascimentos, declinando progressivamente para os asiáticos (2.1/1000 em japonês e 1.7/1000 em chineses), caucasianos (1.0/1000 nascimentos), e africanos (0.3/1000 nascimentos) (Vieira *et al.*, 2002). Essa variação racial é menos notável para a fenda palatina do que para a fenda lábio-palatina (Vieira *et al.*, 2002).

A população brasileira representa uma miscigenação étnica de euro-brasileiros (espanhóis e portugueses, principalmente), afro-brasileiros e ameríndios, o que torna muito difícil correlacionar perfeitamente a etnicidade dos indivíduos casos com os controles (Vieira *et al.*, 2002; Bertoja *et al.*, 2008). As diferenças de colonização das várias regiões brasileiras (africanos e europeus, principalmente) e a intensa migração da região nordeste para a sudeste fazem com que a distribuição genotípica seja muito variável numa mesma região e de uma região para outra no Brasil. Isso pode dificultar estudos caso-controle quando a população brasileira está sob investigação.

Mesmo assim, estudos que detectam a ocorrência de associação entre FL/PNS e marcadores genéticos, como os polimorfismos, podem contribuir ao conhecimento dessa malformação, bem como ajudar na identificação de características herdadas que contam para um aumento da susceptibilidade individual no distúrbio multifatorial que representa as FL/PNS.

Torna-se necessária uma avaliação genotípica do polimorfismo V274I nas mães e nos pais dos pacientes com FL/PNS em nossa população, para que se possa definir com mais exatidão o perfil de transmissão dos alelos G e A do polimorfismo avaliado nos pacientes com FL/PNS na população brasileira.

7. Conclusões

Após a realização do estudo, conclui-se que:

1. Duas novas mutações (520delG, T1135A) foram identificadas no gene IRF6 em duas famílias brasileiras afetadas pela SVW.
2. Tais mutações alteraram a função normal do domínio SMIR da proteína do IRF6, sugerindo que esse domínio é essencial para a função correta do gene.
3. SVW ocorreu pela haploinsuficiência do gene IRF6, sugerindo uma participação direta desse gene no desenvolvimento craniofacial.
4. Não houve diferença estatística significativa do polimorfismo V274I (820G>A) nos grupos analisados, sugerindo que a sua presença não é um fator etiológico isolado para o desenvolvimento de FL/PNS.

Referências*

1. Au WC, Yeow WS, Pitha PM: Analysis of functional domains of interferon regulatory factor 7 and its association with IRF-3. *Virology*. 2001; 280: 273-282.
2. Bailey CM, Khalkhali-Ellis Z, Kondo S, Margaryan NV, Seftor RE, Wheaton WW, Amir S, Pins MR, Schutte BC, Hendrix MJ. Mammary serine protease inhibitor (Maspin) binds directly to interferon regulatory factor 6: identification of a novel serpin partnership. *J Biol Chem*. 2005; 280: 34210-7.
3. Bailey CM, Abbott DE, Margaryan NV, Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJ. Interferon regulatory factor 6 promotes cell cycle arrest and is regulated by the proteasome in a cell cycle-dependent manner. *Mol Cell Biol*. 2008; 28: 2235-43. (a)
4. Bailey CM, Abbott DE, Hendrix MJ. IRF6 in development and disease: a mediator of quiescence and differentiation. *Cell Cycle*. 2008; 7(13): 1925-1930. (b)
5. Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisancho JA, Pitha PM. Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Res*. 2003; 63: 6424–6431.
6. Ben J, Jabs EW, Chong SS. Genomic, cDNA and embryonic expression analysis of zebrafish IRF6, the gene mutated in the human oral clefting disorders van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Gene Expr Patterns*. 2005; 5:629-638.
7. Bertoja EA, Alho CS, De França E, Menegotto B, Robinson WM. TGFA/TAQ I polymorphism in nonsyndromic cleft lip and palate patients from Rio Grande Do Sul, Brazil. *Cleft Palate Craniofac J*. 2008; 45(5):539-44.

*De acordo com a norma UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

8. Birnbaum S, Reutter H, Lauster C, Scheer M, Schmidt G, Saffar M, Martini M, Hemprich A, Henschke H, Kramer FJ, Mangold E. Mutation screening in the IRF6-gene in patients with apparently nonsyndromic orofacial clefts and a positive family history suggestive of autosomal-dominant inheritance. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A(6): 787-90.
9. Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell H. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic. *Am J Med Genet A*. 2005; 137A: 259-262.
10. Brookes JT, Canady JW. Surgical correction of congenital lower lip sinuses in van der Woude syndrome. *Cleft Palate Craniofac J*. 2007; 44(5): 555-7.
11. Burdick AB, Ma LA, Dai ZH, Gao NN. Van der Woude syndrome in two families in China. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1987; 7: 413-418.
12. Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update. *Int J Pediatr Otorhinolar*. 2007; 71(10): 1509-19.
13. Charrier JB, Rouillon I, Roger G, Denoyelle F, Collon S, Garabedian EN. Congenital isolated midline sinus of the upper lip: clinical and embryological approaches. *Cleft Palate Craniofac J*. 2006; 43(4): 488-91.
14. Conners GP. van der Woude syndrome. *eMedicine J* 4; <http://www.emedicine.com/ped/topic2753.htm>.
15. Dellino GI, Schwartz YB, Farkas G, McCabe D, Elgin SC, Pirrotta V. Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol Cell*. 2004; 13: 887-893.
16. Dissemond J, Haberer D, Franckson T, Hillen U. The van der Woude syndrome: a case report and review of the literature. *JEADV*. 2004; 18: 611-613.
17. Du X, Tian TW, Li S, Li X, Liu L, Zheng X *et al*. Novel IRF6 mutations in Chinese patients with van der Woude syndrome. *J Dent Res*. 2006; 85(10): 937-940.

18. Eroshkin A, Mushegian A. Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens. *J Mol Med.* 1999; 77(5): 403-5.
19. Fitzpatrick DR, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst RJ. Differential expression of TGF β isoforms in murine palatogenesis. *Development.* 1990; 109: 585-595.
20. Gatta V, Scarciolla O, Cupaioli M, Palka C, Chiesa PL *et al.* A novel mutation of the IRF6 gene in a Italian family van der Woude syndrome. *Mutat Res.* 2004; 547: 49-53.
21. Ghassibé M, Revencu N, Bayet B, Gillerot Y, Vanwijck R *et al.* Six families with van der Woude and/or popliteal pterygium syndrome: all with a mutation in the IRF6 gene. *J Med Genet.* 2004; 41: e15.
22. Ghassibé M, Bayet B, Revencu N, Verellen CD, Gillerot Y *et al.* Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population. *Eur J Human Genet.* 2005; 13: 1239-1242.
23. Gorlin R, Cohen M, Hennekam R. *Syndromes of the head and neck.* 4th ed. New York: Oxford University Press. 2001.
24. Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999; 41: 95-98.
25. Huang JJ, Hou JW, Tan YC, Chen KT, Lo LJ, Chen YR. Van der Woude syndrome: clinical presentation in 64 patients. *Cleft Palate Craniofac J.* 2007; 44(6): 649-652.
26. Ingraham C, Kinoshita A, Kondo S, Yang B, Sajan S, Trout KT *et al.* Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (*Irf6*). *Nat Genet.* 2006; 38(11): 1335-1340.
27. Item CB, Turhani D, Thurnher D, Yerit K, Sinko K, Wittwer G *et al.* Van der Woude syndrome: variable penetrance of a novel mutation

- (p.Arg84Gly) of the IRF6 gene in a Turkish family. *Intern J Mol Med.* 2005;15: 247-251.
28. Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C *et al.* Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2003; 40: 399-407.
29. Jugessur A, Rahimov F, Lie RT, Wilcox AJ, Gjessing HK, Nilsen RM, Nguyen TT, Murray JC. Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway. *Genet Epidemiol.* 2008; 32(5): 413-24.
30. Kane AA, Liao YF, Lo LJ, Huang CS, Huang LM, Chen YR *et al.* A cephalometric study of facial growth in van der Woude syndrome. *Cleft Palate Craniofac J.* 2002; 39: 219-25.
31. Kayano S, Kure S, Suzuki Y, Kanno K, Aoki Y, Kondo S, Schutte BC, Murray JC, Yamada A, Matsubara Y. Novel IRF6 mutations in Japanese patients with van der Woude syndrome: two missense mutations (R45Q and P396S) and a 17-Kb deletion. *J Hum Genet.* 2003; 48: 622-628.
32. Kim Y, Park JY, Lee TJ, Yoo HW. Identification of two novel mutations of IRF6 in Korean families affected with van der Woude syndrome. *Int J Mol Med.* 2003; 12: 465-468.
33. Kirzioğlu Z, Ertürk MSÖ. Congenital lower lip pits (van der Woude syndrome): report of a case. *J Contemp Dent Pract.* 2006; 1(7): 134-140.
34. Knight, AS, Schutte BC, Jiang R, Dixon MJ. Developmental Expression Analysis of the Mouse and Chick Orthologues of IRF6: The gene mutated in van der Woude syndrome. *Develop Dynam.* 2006; 235: 1441-1447.
35. Koillinen H, Wong FK, Rautio J, Ollikainen V, Karsten A, Larson O *et al.* Mapping of the second locus for the van der Woude syndrome to chromosome 1p34. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9: 747-752.

36. Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS *et al.* Mutation in IRF6 cause van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet.* 2002; 32: 285-289.
37. Lacombe D, Pedespan JM, Fontan D, Chateil JF, Verloes A. Phenotypic variability in van der Woude syndrome. *Genet Couns.* 1995; 6:221–226.
38. Lees MM, Winter RM, Malcolm S, Saal HM, Chitty L. Popliteal pterygium syndrome: a clinical study of three families and report of linkage to the van der Woude syndrome locus 1q32. *J Med Genet.* 1999; 36: 888-892.
39. Loffredo L, Freitas J, Grigolli A. Prevalência de fissuras orais de 1975 a 1994. *Rev Saúde Pública.* 2001; 35(6): 571-5.
40. Lopes MA, Goncalves M, Di Hipolito Júnior O, de Almeida OP. Congenital lower lip pits: case report and review of literature. *J Clin Pediatr Dent.* 1999; 23(3):275-7.
41. Luke AJ, O'Neill. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18: 3-9.
42. Mamane Y, Heylbroeck C, Génin P, Algarté M, Servant MJ, Le Page C, De Luca C *et al.* Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene.* 1999; 237: 1-14.
43. Martelli-Junior HM, Chaves MR, Swerts MSM, Miranda RT, Bonan PRF, Coletta RD. Clinical and genetic features of van der Woude syndrome in two large families in Brazil. *Cleft Palate Craniofac J.* 2006; 44(6): 33-37.(a)
44. Martelli-Júnior H, Orsi Júnior J, Chaves MR, Barros LM, Bonan PRF, Freitas JA. Estudo epidemiológico das fissuras labiais e palatais em Alfenas - Minas Gerais - de 1986 a 1998. *RPG.* 2006; 13(1): 31-35.(b)
45. Matsuzawa N, Yoshiura KI, Machida J, Nakamura T, Niimi T, Furukawa H *et al.* Two missenses mutations in the IRF6 gene in two Japanese families with van der Woude syndrome. *O O O O Radiol Endod.* 2004; 98: 414-7.

46. Matsuzawa N, Shimozato K, Natsume N, Niikawa N, Yoshiura K. A novel missenses mutation in van der Woude Syndrome: Usefulness of fingernail DNA for genetic analysis. *J Dent Res.* 2006; 85(12): 1143-1146.
47. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT: The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics.* 2000; 16: 404-405.
48. Medeiros F, Hansen L, Mawlad E, Eiberg H, Asklund C, Tommerup N *et al.* A novel mutation in IRF6 resulting in VWS–PPS spectrum disorder with renal aplasia. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A: 1605–1608.
49. Menko FH, Koedijk PH, Baart JA, Kwee ML. Van der Woude syndrome - recognition of lesser expressions: case report. *Cleft Palate Craniofac J.* 1988; 25(3): 318-321.
50. Morkuniene A, Steponaviciuté D, Kasnauskiene J, Kucinskas V. Nucleotide sequence changes in the MSX1 and IRF6 genes in Lithuanian patients with nonsyndromic orofacial clefting. *Acta Med Lituanica.* 2006; 13(4): 219-225.
51. Nawa H, Oberoi S, Vargervik K. Taurodontism and van der Woude syndrome. *The Angle Orthodontist.* 2008; 78(5): 832–837.
52. Nopoulos P, Richman L, Andreasen NC, Murray JC, Schutte B. Abnormal brain structure in adults with van der Woude syndrome. *Clin Genet.* 2007; 71: 511–517. (a)
53. Nopoulos P, Richman L, Andreasen N, Murray JC, Schutte B. Cognitive dysfunction in adults with van der Woude syndrome. *Genet Med.* 2007; 9(4): 213–218.(b)
54. Oberoi S, Vargervik K. Hypoplasia and hypodontia in van der Woude syndrome. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005; 42: 459-466.
55. Onofre MA, Brosco HB, Taga R. Relationship between lower-lip fistulae and cleft lip and/or palate in van der Woude syndrome. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997; 34(3): 261-265.

56. Paranaíba LMR, Almeida H, Barros LM, Martelli DRB, Orsi-Júnior JD, Martelli-Júnior H. Reabilitação cirúrgica de fissuras lábio-palatinas, no estado de Minas Gerais, Brasil. Rev Bras Otorrinol. in press. 2009.
57. Pastinen T, Sladek R, Gurd S *et al*: A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression. Physiol Genomics. 2004; 16: 184-193.
58. Pegelow M, Peyrard-Janvid M, Zucchelli M, Fransson I, Larson O, Kere J, Larsson C, Karsten A. Familial non-syndromic cleft lip and palate: analysis of the IRF6 gene and clinical phenotypes. Eur J Orthod. 2008; 30(2): 169-75.
59. Peyrard JM, Pegelow M, Koillinen H, Larsson C, Fransson I, Rautio J, Hukki J, Larson O, Karsten AL-A, Kere J. Novel and *de novo* mutations of the IRF6 gene detected in patients with van der Woude and popliteal pterygium syndromes. Eur J Hum Genet. 2005; 13: 1261-1267.
60. Puvabanditsin S, Garrow E, Sitburana O, Avila FM, Nabong MY, Biswas A. Syngnathia and van der Woude syndrome. Cleft Palate Craniofac J. 2003; 40(1): 104-106.
61. Richardson RJ, Dixon J, Malhotra S, Hardman MJ, Knowles L *et al*. Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. Nat Genet. 2006; 38(11): 1329-1334.
62. Rizos M, Spyropoulos, MN. van der Woude syndrome: a review. Cardinal signs, epidemiology, associated features, differential diagnosis, expressivity, genetic counselling and treatment. Eur J Orthod. 2004; 26: 17-24.
63. Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P *et al*. Strong evidence of linkage disequilibrium polymorphisms at the irf6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. Am J Hum Genet. 2005; 76: 180-183.
64. Schinzel A, Klausler M. The van der Woude syndrome (dominantly inherited lip pits and clefts). J Med Genet. 1986; 23: 291– 294.

65. Shanske AL, Hoper SA, Schutte BC. Mutations in IRF6 do not cause Bartsocas-Papas syndrome in a family with two affected sibs. *Am J Med Genet.* 2004; 128A: 431-433.
66. Shotelersuk V, Srichomthong C, Yoshiura K, Nikawa N. A novel mutation, 1234del(C), of the IRF6 in a Thai family with van der Woude syndrome. *Int J Mol Med.* 2003; 11: 505-507.
67. Shprintzen RJ, Goldberg RB, Sidoti EJ. The penetrance and variable expression of the van der Woude syndrome: implications for genetic counseling. *Cleft Palate Craniofac J.* 1980; 17(1): 52-57.
68. Sertie AL, Sousa AV, Steman S, Pavanello RC, Passos-Bueno MR. Linkage analysis in a large Brazilian family with van der Woude syndrome suggests the existence of a susceptibility locus for cleft palate at 17p11.2-11.1. *Am J Hum Gene.* 1999; 65: 433-440.
69. Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo.* 1972; 27(1): 5-6.
70. Souto LRM. Congenital bilateral lower lip pits associated with fistulae of the minor salivary glands: case report of the principal van der Woude syndrome's trait. *Aesth Plast Surg.* 2008; 32: 172-174.
71. Srichomthong C, Siriwan P, Shotelersuk V. Significant association between IRF6 820G>A and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Thai population. *J Med Genet.* 2005; 42: e46.
72. Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Linkage disequilibrium between IRF6 variants and nonsyndromic cleft lip/palate in the Chilean population. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A (20): 2706-8.
73. Suda N, Takada J, Ohyama K. Orthodontic treatment in a patient with van der Woude's syndrome. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 129(5): 696-705.

74. Tang W, Du X, Feng F, Long J, Lin Y, Li P *et al.* Association Analysis Between the IRF6 G820A Polymorphism and Nonsyndromic Cleft Lip and/or Cleft Palate in a Chinese Population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2009; 46(1):89-92.
75. Van der Woude A. Fistula labii inferioris congenita and its association with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet.* 1954; 6: 244–256.
76. Van Heyningen V, Yeyati PL: Mechanisms of non- Mendelian inheritance in genetic disease. *Hum Mol Genet.* 2004; 13: 225-233.
77. Vieira AR, Karras JC, Orioli IM, Castilla EE, Murray JC. Genetic origins in a South American clefting population. *Clin Genet.* 2002; 62: 458-463.
78. Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Orioli IM, Castilla EE. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America. *Am J Med Genet A.* 2007; 143A: 2075-2078.(a)
79. Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa ARS, Lidral AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet A.* 2007; 143A: 538-545.(b)
80. Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008; 87(2): 119-25.
81. Wang X, Liu J, Zhang H, Xiao M, Li J, Yang C, Lin X *et al.* Novel mutations in the IRF6 gene van der Woude syndrome. *Hum Genet.* 2003; 113: 382-386.
82. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science.* 1999; 286: 481-486.
83. Yan H, Yuan W, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW. Allelic variation in human gene expression. *Science.* 2002; 297: 1143.
84. Ye XQ, Jin HX, Shi LS, Fan MW, Song GT *et al.* Identification of novel mutations of IRF6 gene in Chinese families with van der Woude syndrome. *Inter J Mol Med.* 2005; 16: 851-856.

85. Ziai MN, Benson AG, Djalilian HR. Congenital lip pits and van der Woude syndrome. *J Craniofac Surg*. 2005; 16: 930-932.
86. Zuccherro T, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L *et al*. Interferon regulatory factor (IRF6) is a modifier for isolated cleft lip and palate. *N Engl J Med*. 2004; 351: 769–80.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



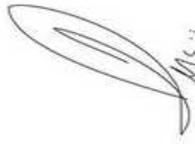
CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise da frequência de mutações no gene do fator regulador de interferon 6 (IRF6) em 2 famílias brasileiras afetadas pela síndrome de Van der Woude**", protocolo nº 068/2007, dos pesquisadores Ricardo Della Coletta e Lívia Máris Ribeiro Paranaíba, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 12/10/2007.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Frequency of mutations in interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene in two Brazilian families with Van der Woude syndrome**", register number 068/2007, of Ricardo Della Coletta and Lívia Máris Ribeiro Paranaíba, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at .



Prof. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Novel mutations in the IRF6 gene in Brazilian families with Van der Woude syndrome

LÍVIA MÁRIS RIBEIRO PARANAÍBA¹, HERCÍLIO MARTELLI-JÚNIOR^{2,3},
MÁRIO SERGIO OLIVEIRA SWERTS³, SERGIO R.P. LINE⁴ and RICARDO D. COLETTA¹

¹Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry, State University of Campinas, Av. Limeira 901, CEP 13414-018 Piracicaba, São Paulo; ²Stomatology Clinic, Dental School, State University of Montes Claros, Caixa Postal 126, CEP 39401-089 Montes Claros, Minas Gerais; ³Center for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, Dental School, University of Alfenas, Rod. MG 179, Km 0, CEP 37130-000 Alfenas, Minas Gerais; ⁴Department of Morphology, School of Dentistry, State University of Campinas, Av. Limeira 901, CEP 13414-018 Piracicaba, São Paulo, Brazil

Received April 17, 2008; Accepted July 3, 2008

DOI: 10.3892/ijmm_00000049

Abstract. Van der Woude Syndrome (VWS) is an autosomal craniofacial disorder characterized by lower lip pits and cleft lip and/or palate. Mutations in the interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene have been identified in patients with VWS. To identify novel IRF6 mutations in patients affected by VWS, we screened 2 Brazilian families, sequencing the entire IRF6-coding region and flanking intronic boundaries. Two novel heterozygous mutations were identified: a frame shift mutation with deletion of G at the nucleotide position 520 in the exon 6 (520delG), and a missense single nucleotide substitution from T to A at nucleotide position 1135 in exon 8 (T1135A). By using restriction enzyme analysis, we were able to demonstrate the lack of similar mutations in unrelated healthy individuals and non-syndromic cleft lip and palate patients. Our results further confirmed that haploinsufficiency of the IRF6 gene results in VWS.

Introduction

Van der Woude syndrome (VWS) (OMIM #119300) is a rare craniofacial disorder characterized by lower lip pits, cleft lip and/or palate (CL/P) and, occasionally, hypodontia (1,2). This syndrome occurs in approximately 2% of CL/P patients, and is distinguished from non-syndromic CL/P by the presence of lip pits (3). Its incidence is estimated at 1-2.5 cases per 100,000 live births (4). VWS is transmitted in an autosomal dominant mode with high penetrance and varied clinical expression (expressivity); however, 30-50% of VWS cases

represent *de novo* mutations (1,4,5). Mutations in the interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene have been found in patients with VWS (6). To date, more than 70 different mutations in the IRF6 gene have been reported in VWS affected patients worldwide (5-17). IRF6 belongs to a family of 9 transcription factors that share a highly conserved helix DNA-binding, and a protein-interactive domain in the carboxyl-terminal region called Smad-interferon regulatory factor-binding domain (SMIR) (18). Most IRF members regulate the expression of interferon α and β after viral infection (19), but the exact function of IRF6 remains unknown. Mutations in the IRF6 gene also can cause popliteal pterygium syndrome (MIM #119500), which shares some common features with VWS (14).

We recently described the clinical features of 2 large Brazilian families affected by VWS (20). In the first family, VWS was transmitted as an autosomal dominant character with apparent low penetrance. All the affected members demonstrated association of bilateral paramedian lower lip pits and CL/P. In the second family, segregation of VWS was consistent with an autosomal dominant mode with penetrance appearing complete, and the expressivity was distinct among affected members. Here, by sequencing the entire coding region of the IRF6 gene of the 2 VWS families, we located 2 novel mutations (520delG and T1135A). The T1135A mutation is located in the SMIR protein-interactive domain and the 520delG abolishes this region, presumably affecting the regulatory functions of IRF6 in the transcriptional control of the downstream target genes.

Materials and methods

Families with VWS and controls. Pedigree and clinical details of the 2 VWS families were previously described (20). From Family 1, which is composed of 54 descendants with 12 presented features of VWS, sequencing analysis was performed on 6 affected members and 10 unaffected members. In Family 2, comprising 19 descendants with 8 affected by VWS, sequencing analysis was performed on all members.

As a control, 100 unrelated healthy individuals and 50 patients with non-syndromic CL/P were recruited and

Correspondence to: Dr Ricardo D. Coletta, Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry, State University of Campinas, Av. Limeira 901, CEP 13414-018 Piracicaba, São Paulo, Brazil
E-mail: coletta@fop.unicamp.br

Key words: Van der Woude syndrome, interferon regulatory factor 6 gene, mutation

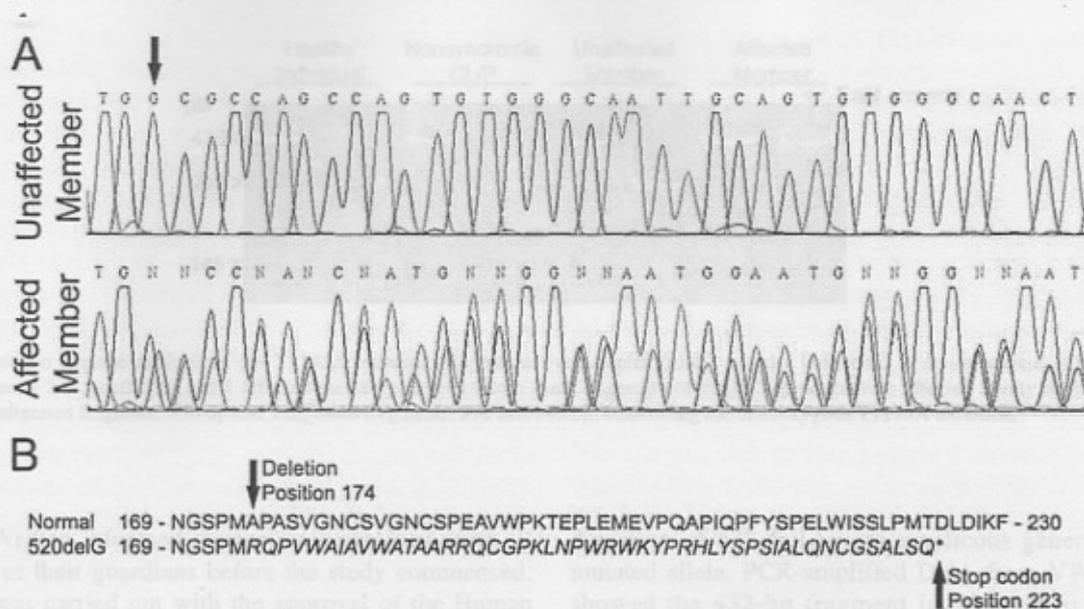


Figure 1. Identification of an undescribed IRF6 mutation in the VWS Family 1 of this study. (A) Portions of representative DNA-sequence electropherograms of an unaffected (top) and an affected (bottom) member of Family 1. Arrow indicates the altered nucleotide. The affected member is heterozygous for the deletion of G at the nucleotide position 520 of IRF6 (520delG). (B) A portion of the normal amino acid sequence of IRF6 was aligned with the mutated sequence. The amino acid sequence newly created by the 520delG mutation is indicated in italics. Note that this mutation resulted in the subsequent change of 49 amino acids, ending in a premature termination at amino acid 223.

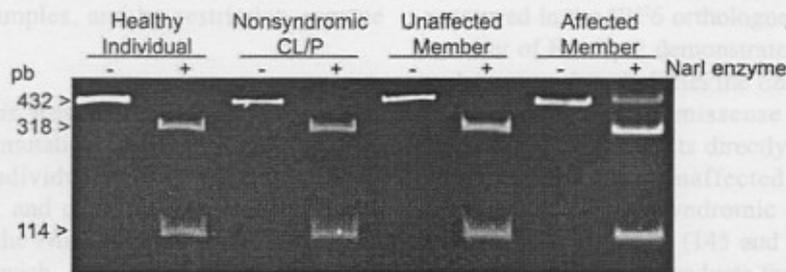


Figure 2. Restriction enzyme analysis of the 520delG mutation. Representative samples from 1 healthy individual, 1 non-syndromic CL/P patient, and 2 members of Family 1 (1 unaffected and 1 affected member). The 520delG mutation eliminates the *NarI* site, thus preserving the digestion of the 432 full-length amplicons generated from the mutated allele. PCR-amplified DNA from VWS individuals showed the 432-bp fragment in addition to the 318- and 114-bp fragments originating from the normal digested allele. DNA from healthy individuals, non-syndromic CL/P patients, and unaffected family members demonstrated only the 318- and 114-bp fragments.

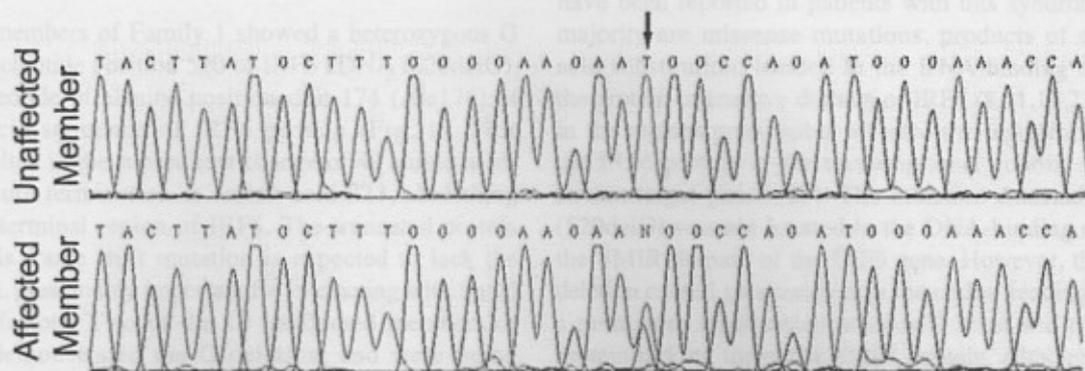


Figure 3. DNA-sequence electropherograms showing the IRF6 mutation identified in VWS patients of Family 2. The top electropherogram represents a portion of IRF6 exon 8 of an unaffected member. The results of an affected member are demonstrated on the bottom electropherogram. VWS patients are heterozygous at position 1135, as revealed by the transversion of T to A (arrow), causing the substitution of a tryptofano to arginine (W379R).

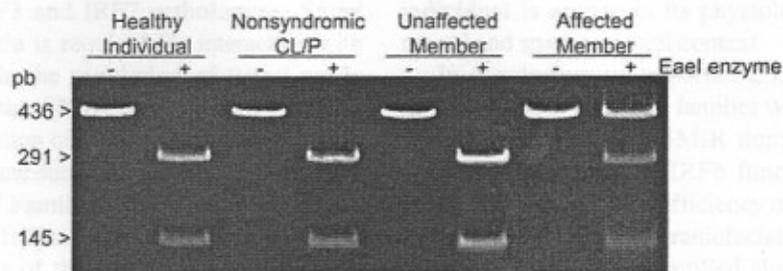


Figure 4. Restriction enzyme analysis of the T1135A mutation. Representative samples from 1 healthy individual, 1 non-syndromic CL/P patient, and 2 members of Family 2 (1 unaffected and 1 affected member), digested with *EaeI*. Digestion of the PCR product from affected family members resulted in 3 fragments: 1 undigested fragment, 436 bp and 2 digested fragments, 291 and 145 bp, confirming the heterozygous T1135A mutation.

examined. Written informed consent was obtained from all participants or their guardians before the study commenced. This study was carried out with the approval of the Human Research Ethics Committee of the University.

Sequence analysis. Genomic DNA was extracted from oral mucosa cells as previously described (21). Exons 1-9 and their flanking splice junctions were PCR amplified with specific primers (9). This was followed by direct sequencing in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi). Detected mutations in affected members were confirmed by repetition of the sequence analysis on new DNA samples, and by restriction enzyme analysis.

Restriction enzyme analysis. Restriction enzyme analysis was performed to confirm the mutations in affected members and to analyze the control individuals. Exon 6 PCR products amplified from Family 1 and control DNA samples, were directly incubated with the *NarI* restriction enzyme (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA), whereas exon 8 PCR products from Family 2 and controls were incubated with the *EaeI* restriction enzyme (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). The same pairs of primers for the sequencing analysis were used here. After incubation, the products were electrophoresed on an 8% non-denaturing polyacrylamide gel containing 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of ethidium bromide.

Results

All affected members of Family 1 showed a heterozygous G deletion at nucleotide position 520 of IRF6 cDNA (520delG), the first nucleotide of alanine positioned at 174 (Ala174) of the amino acid sequence of IRF6 protein (Fig. 1). This mutation resulted in the subsequent change of 49 amino acids and a premature termination at amino acid 223, abolishing the carboxyl-terminal region of IRF6. The truncated protein caused by this frame shift mutation is expected to lack the SMIR domain, presumably important for interacting with Smad transcription factors. Two of the 10 unaffected members of this family demonstrated the G deletion, and were being considered carrier members. To further confirm this finding, we performed restriction enzyme analysis in all Family 1 members and in the control individuals (Fig. 2). The 520delG mutation eliminates the *NarI* site, thus preserving the

digestion of 432 full-length amplicons generated from the mutated allele. PCR-amplified DNA from VWS individuals showed the 432-bp fragment in addition to the 318- and 114-bp fragments from the normal digested allele, while unaffected family members, healthy control individuals and non-syndromic CL/P patients demonstrated only the 318- and 114-bp fragments (Fig. 2).

In Family 2, the heterozygous T to A transversion at nucleotide position 1135 of exon 8 of IRF6 (T1135A) resulted in a tryptofano to arginine substitution at codon 379 (W379R) of the IRF6 amino acid sequence (Fig. 3). The 379 residue is located in the SMIR-binding domain, which is absolutely conserved in the IRF6 orthologues. One clinically unaffected member of Family 2 demonstrated this mutation. Since the T to A transversion abolishes the *EaeI* restriction site in the exon 8, we confirmed the missense mutation (1135 T>A) by incubating PCR products directly with *EaeI* enzyme. Exon 8 PCR products from unaffected family members, healthy individuals and non-syndromic CL/P, incubated with *EaeI* resulted in 2 fragments (145 and 291 bp). However, enzyme incubation with PCR products from affected family members resulted in 3 fragments [1 undigested, originating from the mutated amplicon (436 bp) and 2 digested fragments], confirming the specificity of the mutation (Fig. 4).

Discussion

Since the first identification of the IRF6 mutation in VWS patients by Kondo *et al* (6), more than 70 different mutations have been reported in patients with this syndrome. The vast majority are missense mutations, products of single amino acid substitution, located in the DNA-binding domain or in the protein-interactive domain of IRF6 (8,11,13,22). Mutations in the regions presumably affected the regulatory function of the IRF6 protein at the transcriptional control of the downstream target genes (23). The mutation detected in Family 1 (520delG) was not located in the DNA-binding domain or in the SMIR domain of the IRF6 gene. However, the nucleotide deletion caused an alteration in the codon-reading, introducing a premature termination at exon 7 level and resulting in a protein lacking the entire SMIR domain. Although the precise function of IRF6 is unclear, the lack of the SMIR domain inhibits the interaction with Smad transcription factors, which are well known to transduce transforming growth factor- β signals, that play an essential role in palate and lip formation

and fusion (24,25). In IRF3 and IRF7 orthologues, Smad binding to the SMIR domain is required for interaction with other transcription factors in the regulation of target genes (26). It is presumed that the SMIR domain also plays an essential role in the dimerization of IRF6 protein (26).

The tryptophane to arginine substitution (W379R) observed in the affected members of Family 2, occurred in the SMIR domain. This residue of tryptophane at position 379 is conserved in all 9 members of the IRF family. Around this amino acid, other substitutions, including phenylalanine to serine at position 369 (F369S), cysteine to tyrosine at position 374 (C374Y), and lysine to glutamic acid at position 388 (K388E) have been reported (6,11,16). Notably, at this same tryptophane residue, Wang *et al.* (8) related a TGG to TGA transition, resulting in a premature stop codon (p.W379X). By using bioinformatics analysis (27,28), we observed that the tryptophane to arginine substitution resulted in an alteration in the hydrophobic profile of the protein and in a shift in the protein secondary structure, suggesting biological effects in the regulatory activity of IRF6. Collectively, our data demonstrate that mutations in IRF6, resulting in alterations in the SMIR domain, are etiological for VWS, since those same mutations were not found in 100 healthy control individuals and in 50 control patients with isolated CL/P.

VWS is characterized by high penetrance and varied expressivity (1,4,5). Pedigree analysis of Family 1 suggested a low penetrance (20), which was confirmed by mutation analysis. Two clinically unaffected members showed the same mutation observed in the VWS members. Notably, one of the carriers had an affected twin brother, and the second carrier had her mother and one of her 5 siblings phenotypically and genotypically affected. In Family 2, one member with no signs of VWS was a mutation carrier. This implies incomplete penetrance of the T1135A mutation, contrasting with the clinical analysis of the pedigree. Although some studies state that low penetrance is due to the lack of recognition of patients with microforms or subclinical forms of the disease (29), in this study, all patients were carefully examined. Comparing the 2 mutations, the 520delG mutation resulted in a truncated protein and in a homogeneous and more severe phenotype. The lack of the entire SMIR domain probably abolishes the protein function. However, single nucleotide substitution in the SMIR domain, resulting in normal-sized protein, under the influence of stochastic factors or modifier genes, produced a protein with imprecise functions, resulting in a marked phenotypic variation. Mechanisms underlying penetrance and expressivity include the influence of alleles, modifier genes, gender, and environmental factors (30), so VWS is subject to genetic and environmental variation. It is becoming clear that there are many allelic variants throughout the genome, and these are not just coding variants. Differences in transcriptional control through promoter and enhancer differences are increasingly emerging (31,32). Furthermore, gene expression is clearly subject to complex epigenetic control (33), and we are just beginning to understand the rules involved in the modulation of chromatin structure (34). Finally, environmental variation plays a major role in modulating all aspects of gene expression, particularly in CLP (35), but individual responses to environmental factors are under partial genetic control. Each mutation observed in any

individual is unique in its physiological, genomic, environmental and spatiotemporal context.

In conclusion, we reported 2 novel mutations (520delG and T1135A) in Brazilian families with VWS. These mutations produced an impaired SMIR domain, suggesting that this domain is essential for IRF6 function. Furthermore, VWS occurs from the haploinsufficiency of IRF6, suggesting a direct participation of IRF6 in craniofacial development. High levels of IRF6 mRNA were identified along the medial edge of the fusing palate during embryogenesis of mice (6).

Acknowledgements

We are grateful to Drs Letícia Monteiro de Barros and Marcelo Reis Chaves for assistance with the sample collection. We also thank Dr Siu Mui Tsai for allowing us to use a DNA sequencer. This work was supported by grants from The Minas Gerais State Research Foundation-FAPEMIG, Brazil, and from The National Council for Scientific and Technological Development-CNPq, Brazil. L.M.R Paranaíba is supported by Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, Brazil.

References

- Huang JJ, Hou JW, Tan YC, Chen KT, Lo LJ and Chen YR: Van der Woude syndrome: clinical presentation in 64 patients. *Cleft Palate Craniofac J* 44: 649-652, 2007.
- Oberoi S and Vargervik K: Hypoplasia and hypodontia in Van der Woude syndrome. *Cleft Palate Craniofac J* 42: 459-466, 2005.
- Janku P, Robinow M, Kelly T, Bralley R, Baynes A and Edgerton MT: The van der Woude syndrome in a large kindred: variability, penetrance, genetic risks. *Am J Med Genet* 5: 117-123, 1980.
- Rizos M and Spyropoulos MN: Van der Woude syndrome: a review. Cardinal signs, epidemiology, associated features, differential diagnosis, expressivity, genetic counselling and treatment. *Eur J Orthod* 26: 17-24, 2004.
- Item CB, Turhani D, Thurnher D, *et al.*: Van Der Woude syndrome: variable penetrance of a novel mutation (p.Arg 84Gly) of the IRF6 gene in a Turkish family. *Int J Mol Med* 15: 247-251, 2005.
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, *et al.*: Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* 32: 285-289, 2002.
- Brosch S, Baur M, Blin N, Reinert S and Pfister M: A novel IRF6 nonsense mutation (Y67X) in a German family with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med* 20: 85-89, 2007.
- Wang X, Liu J, Zhang H, *et al.*: Novel mutations in the IRF6 gene for Van der Woude syndrome. *J Hum Genet* 113: 382-386, 2003.
- Kayano S, Kure S, Suzuki Y, *et al.*: Novel IRF6 mutations in Japanese patients with Van der Woude syndrome: two missense mutations (R45Q and P396S) and a 17-kb deletion. *J Hum Genet* 48: 622-628, 2003.
- Kim Y, Park JY, Lee TJ and Yoo HW: Identification of two novel mutations of IRF6 in Korean families affected with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med* 12: 465-468, 2003.
- Peyrard-Janvid M, Pegelow M, Koillinen H, *et al.*: Novel and de novo mutations of the IRF6 gene detected in patients with Van der Woude or popliteal pterygium syndrome. *Eur J Hum Genet* 13: 1261-1267, 2005.
- Gatta V, Scarcioffa O, Cupaioli M, Palka C, Chiesa PL and Stuppia L: A novel mutation of the IRF6 gene in an Italian family with Van der Woude syndrome. *Mutat Res* 547: 49-53, 2004.
- Ye XQ, Jin HX, Shi LS, *et al.*: Identification of novel mutations of IRF6 gene in Chinese families with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med* 16: 851-856, 2005.
- Ghassibe M, Revencu N, Bayet B, *et al.*: Six families with van der Woude and/or popliteal pterygium syndrome: all with a mutation in the IRF6 gene. *J Med Genet* 41: e15, 2004.

15. Matsuzawa N, Yoshiura K, Machida J, *et al*: Two missense mutations in the IRF6 gene in two Japanese families with Van der Woude syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98: 414-417, 2004.
16. Matsuzawa N, Shimozato K, Natsume N, Niikawa N and Yoshiura K: A novel missense mutation in Van der Woude syndrome: usefulness of fingernail DNA for genetic analysis. *J Dent Res* 85: 1143-1146, 2006.
17. Du X, Tang W, Tian W, *et al*: Novel IRF6 mutations in Chinese patients with Van der Woude syndrome. *J Dent Res* 85: 937-940, 2006.
18. Takaoka A, Tamura T and Taniguchi T: Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci* 99: 467-478, 2008.
19. Ozato K, Taylor P and Kubota T: The interferon regulatory factor family in host defense: mechanism of action. *J Biol Chem* 282: 20065-20069, 2007.
20. Martelli-Junior H, Chaves MR, Swerts MS, de Miranda RT, Bonan PR and Coletta RD: Clinical and genetic features of Van der Woude syndrome in two large families in Brazil. *Cleft Palate Craniofac J* 44: 239-243, 2007.
21. Aidar M and Line SR: A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* 18: 148-152, 2007.
22. Dissemond J, Haberer D, Franckson T and Hillen U: The Van der Woude syndrome: a case report and review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 18: 611-613, 2004.
23. Ingraham CR, Kinoshita A, Kondo S, *et al*: Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). *Nat Genet* 38: 1335-1340, 2006.
24. Knight AS, Schutte BC, Jiang R and Dixon MJ: Developmental expression analysis of the mouse and chick orthologues of IRF6: the gene mutated in Van der Woude syndrome. *Dev Dyn* 235: 1441-1447, 2006.
25. Richardson RJ, Dixon J, Malhotra S, *et al*: Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nat Genet* 38: 1329-1334, 2006.
26. Au WC, Yeow WS and Pitha PM: Analysis of functional domains of interferon regulatory factor 7 and its association with IRF-3. *Virology* 280: 273-282, 2001.
27. Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98, 1999.
28. McGuffin LJ, Bryson K and Jones DT: The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16: 404-405, 2000.
29. Wienker TF, Hudek G, Bissbort S, Mayerova A, Mauff G and Bender K: Linkage studies in a pedigree with Van der Woude syndrome. *J Med Genet* 24: 160-162, 1987.
30. Van Heyningen V and Yeyati PL: Mechanisms of non-Mendelian inheritance in genetic disease. *Hum Mol Genet* 13: R225-R233, 2004.
31. Pastinen T, Sladek R, Gurd S, *et al*: A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression. *Physiol Genomics* 16: 184-193, 2004.
32. Yan H, Yuan W, Velculescu VE, Vogelstein B and Kinzler KW: Allelic variation in human gene expression. *Science* 297: 1143, 2002.
33. Wolffe AP and Matzke MA: Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286: 481-486, 1999.
34. Dellino GI, Schwartz YB, Farkas G, McCabe D, Elgin SC and Pirrotta V: Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol Cell* 13: 887-893, 2004.
35. Wong FK and Hagg U: An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med J* 10: 331-336, 2004.