

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

LUCIMARA TEIXEIRA DAS NEVES

Triagem de mutação no éxon 3 do gene *IRF6* em indivíduos com fissura labiopalatina e agenesia dentária: padronização de protocolo para seqüenciamento de DNA genômico a partir de saliva

**Bauru
2009**

LUCIMARA TEIXEIRA DAS NEVES

Triagem de mutação no éxon 3 do gene *IRF6* em indivíduos com fissura labiopalatina e agenesia dentária: padronização de protocolo para seqüenciamento de DNA genômico a partir de saliva

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Odontologia

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Bauru

2009

Neves, Lucimara Teixeira das
N414t Triagem de mutação no éxon 3 do gene *IRF6* em
indivíduos com fissura labiopalatina e agenesia
dentária: padronização de protocolo para
seqüenciamento de DNA genômico a partir de saliva /
Lucimara Teixeira das Neves.
-- Bauru, 2009.
103 p. : il. ; 31cm.

Tese. (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru.
Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da HRAC/USP
Protocolo nº: 183/2008
Data: 25/06/2008

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois Ele me concedeu a vida e me permitiu realizar tantas coisas.

Ao meu esposo Cláudio e ao meu filho Thiago, que fazem de nosso lar meu porto seguro e que me fazem persistir a cada dia em busca de novos caminhos

Aos meus pais, Valter e Helena que sempre me impulsionaram, com todas as forças, para que eu concretizasse meus sonhos

E aos meus irmãos, Glaucia e Júnior que participaram de todas as etapas de minha vida

“Ainda que eu falasse a língua dos homens e falasse a língua dos anjos...”, sem O AMOR DE VOCÊS...EU NADA SERIA...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu amigo em primeiro lugar e orientador em segundo lugar Carlos Ferreira dos Santos, não posso deixar de me dirigir a você carinhosamente como Cebola. Agradeço por essa oportunidade de estar ao seu lado e por compartilhar comigo toda essa sua luz de bondade e seu entusiasmo pelas conquistas. Você é um vitorioso.

A minha amiga e mestra Marcinha, agradeço por tantos exemplos de amor, simplicidade, humildade e desprendimento vivenciados ao longo de tantos anos maravilhosos de convivência diária.

Ao querido Thiago José Dionísio a quem nunca terei como agradecer por tudo que fez para me ajudar

AGRADECIMENTOS

Às minhas amigas especiais Bia e Sueli, pelo carinho com que alimentam nossa amizade.

À querida amiga Roseli pelo carinho, pela amizade e tantos ensinamentos compartilhados

Aos meus amigos do Setor de Odontopediatria Marcinha, Bia, Gisele, Cleide, Vivi, Thayeni, Cleusa, Ana Maria, e aos alunos dessa turma de especialização Aninha, Bia, Helize, Vivian, Patrícia e Marcos. Nas minhas ausências vocês estavam presentes. Muito Obrigada.

A todos os funcionários do HRAC-USP, que participaram direta ou indiretamente deste trabalho. Em especial aos profissionais, auxiliares e alunos da ortodontia e radiologia, local onde realizei a triagem dos pacientes para o estudo. E todos os meus colegas e amigos do Centro Odontológico

Agradeço especialmente a Terumi, diretora da Divisão Odontológica, pelo carinho e pela oportunidade que me foi dada de cursar o doutorado,

Aos professores e funcionários dos departamentos de Histologia e Microbiologia que me “abrigaram”, no momento em que o departamento de Farmacologia iniciou a reforma.

Ao queridos Prof. Flavio e a secretária Vera, a convivência com vocês é um presente.

Aos meus colegas de lab e amigos do doutorado. Em especial a Marcela, Elcia, Cadu e Bella, que estiveram muito presentes nesta fase experimental e sempre torcendo por mim.

A todos os voluntários que aceitaram participar do estudo, por sua prestativa colaboração.

Agradeço a empresa Applied Biosystems na pessoa da gerente Patrícia Munerato pela possibilidade de utilizar o seqüenciador no Centro de Treinamento. Agradeço em especial à Ana Paula e a Lídia pela disponibilidade com que nos receberam.

A Fapesp pelo apoio financeiro no processo no. 2008/08927-8

***“O Poderoso fez em mim maravilhas : Santo é o Seu nome.
A minha alma engrandece ao Senhor, exulta meu espírito
em Deus meu Salvador...”***

(Lc 1, 46-47)

RESUMO

A fissura labiopalatina e a agenesia dentária são consideradas alterações do desenvolvimento embrionário. Esses fenótipos ocorrem em decorrência da interação de fatores genéticos e ambientais, caracterizando um padrão de herança multifatorial. Entre os genes candidatos a esses fenótipos destaca-se o *IRF6*. Para esses estudos genéticos podem ser usadas diferentes metodologias, dentre elas o seqüenciamento direto. A proposta deste estudo foi primeiramente padronizar um protocolo para seqüenciamento direto de DNA genômico a partir de saliva e então investigar mutações ou polimorfismos no éxon 3 do gene *IRF6* em indivíduos com fissura de lábio e palato unilateral não-sindrômica e agenesia dentária. Fizeram parte do estudo 120 voluntários distribuídos em quatro grupos: Grupo 1 - 30 indivíduos com fissura e agenesia dentária; Grupo 2 - 30 indivíduos somente com fissura; Grupo 3 - 30 indivíduos somente com agenesia dentária e Grupo 4 - Controle. Para análise do éxon 3 do gene *IRF6* foi coletada saliva, e a partir desse material foram testados três protocolos para extração de DNA genômico. Além disso, durante a padronização do protocolo para seqüenciamento direto foram avaliadas metodologias diferentes para outras três etapas da preparação das amostras: purificação do produto de PCR, otimização na utilização do BigDye[®] v3.1 Terminator na reação de seqüenciamento e purificação do produto da reação de seqüenciamento. As amostras foram seqüenciadas em Analisador Genético ABI 3130XL e os resultados analisados por meio de programas de computador específicos. Foram pesquisadas, nos eletroferogramas referentes ao éxon 3 do gene *IRF6*, variações nas seqüências de cada indivíduo. Os resultados mostraram que o protocolo de extração de DNA a partir de saliva utilizando InstaGene[™] Matrix associado à proteinase K e dodecil sulfato de sódio 1% foi o que apresentou melhores resultados na quantidade e qualidade do DNA extraído. Em relação à purificação do produto de PCR, o método de escolha foi a purificação em coluna específica. O BigDye[®] v3.1 foi utilizado com sucesso em um volume de 2 µL por reação, e a purificação do produto de seqüenciamento com XTerminator apresentou os melhores resultados. Na triagem de mutação, somente um indivíduo do grupo controle apresentou variação na seqüência do tipo heterozigoto. Concluiu-se que é possível realizar, com sucesso, na plataforma ABI 3130XL, o seqüenciamento direto de DNA genômico extraído a partir de saliva total utilizando os protocolos

padronizados neste trabalho. Concluiu-se também, que neste grupo analisado, não houve associação entre o éxon 3 do gene *IRF6* e os fenótipos fissura labiopalatina não-sindrômica e agenesia dentária.

Palavras-chave: Fenda Labial; Fissura Palatina; Anodontia, Genética, Biologia Molecular

ABSTRACT

Screening of mutation in *IRF6* gene of subjects with cleft lip and palate and tooth agenesis: protocol standardization for sequencing of genomic DNA extracted from saliva

Cleft lip and palate and tooth agenesis are considered changes in embryonic development. These phenotypes occur as a result of the interaction of genetic and environmental factors, suggesting a multifactorial inheritance pattern. Among the candidate genes for these phenotypes *IRF6* appears as one of the most important. Direct sequencing, among other techniques, can be used to perform such genetic studies. The aim of this study was to standardize a protocol for direct sequencing of genomic DNA extracted from whole saliva to allow further search of mutations or polymorphisms in exon 3 of *IRF6* gene in individuals with nonsyndromic cleft lip and palate and tooth agenesis. Volunteers were 120 subjects divided into four groups: Group 1 - 30 individuals with tooth agenesis and cleft, Group 2 - 30 individuals with cleft only, Group 3 - 30 individuals with tooth agenesis only, and Group 4 - Control. For the analysis of the exon 3 of *IRF6* gene, saliva was collected to test three protocols for the extraction of genomic DNA. Additionally, during the protocol standardization for direct sequencing, different methodologies for the other three steps of sample preparation were evaluated: purification of PCR product, optimization of the use of BigDye[®] v3.1 Terminator, and purification of the sequencing product. The samples were sequenced on ABI 3130XL Genetic Analyzer, and the results were analyzed using specific softwares. Heterozygous and homozygous variations in the sequences of the exon 3 of *IRF6* gene of each individual were searched in the electropherograms. The results showed that the protocol for DNA extraction from saliva using Instagene[™] Matrix associated with proteinase K and 1% sodium dodecyl sulfate showed the best results in the quantity and quality of the extracted DNA. As far as the purification of the PCR product, the method of choice was the purification in specific columns. BigDye[®] v3.1 was used with success in a volume 2 μ L per reaction, and the purification of the sequencing product with X-Terminator showed the best results. For the mutation screening, only one individual of the control group presented sequence variation of the heterozygous type. It was concluded that it is possible to successfully perform, on the ABI 3130XL platform, the direct sequencing of genomic DNA extracted from whole saliva using the protocols standardized in this work. It was also concluded that in the group

analyzed, no association between the exon 3 of *IRF6* gene and the phenotypes of nonsyndromic cleft lip and palate and tooth agenesis was found.

Key words: Cleft lip. Cleft Palate. Anodontia. Genetics. Molecular Biology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>IRF6</i>	Interferon Regulatory Factor 6 - Humano
<i>Irf6</i>	Interferon Regulatory Factor 6 - Animais
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
USP	Universidade de São Paulo
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Profis	Sociedade de Promoção social do fissurado lábio-palatal
Uninga	Unidade de Ensino Superior Ingá
A	nucleotídeo (base) adenina
T	nucleotídeo (base) timina
C	nucleotídeo (base) citosina
G	nucleotídeo (base) guanina
F	“forward” ou senso
R	“reverse” ou antisenso
Pmol	picomol
pb	Pares de bases
dNTPs	deoxinucleotídeos
ddNTPs	dideoxinucleotídeos
g	força gravitacional
s	segundos
ng	nanogramas
μL	microlitro
mM	milimolar
μM	micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1 O gene <i>IRF6</i>	21
2 PROPOSIÇÃO	25
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivo Específico.....	27
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
3.1 CASUÍSTICA.....	30
3.2 MÉTODOS – ANÁLISE MOLECULAR.....	33
3.2.1 Estudo Piloto	33
3.2.2 Coleta e Preparação das amostras dos grupos de estudo.....	34
3.2.2.1 Coleta de saliva.....	34
3.2.2.2 Extração do DNA genômico das amostras de saliva.....	35
3.2.2.3 Quantificação do DNA extraído da saliva	38
3.2.2.4 Diluição das amostras de DNA para PCR.....	39
3.2.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	39
3.2.2.6 Eletroforese em gel de agarose para verificar a amplificação do éxon 3 do gene <i>IRF6</i>	41
3.2.2.7 Purificação do produto de PCR.....	41
3.2.2.8 Reação de seqüenciamento.....	43
3.2.2.9 Purificação do produto da reação de seqüenciamento	46
3.2.2.10 Leitura no Seqüenciador	48
3.2.2.11 Análise das seqüências obtidas	49
3.3 Análise Estatística	50

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Análise Molecular – Estudo Piloto	55
4.1.1 Análise de fluidos para extração de DNA genômico	55
4.1.2 Padronização da temperatura de anelamento para PCR do éxon 3 do gene <i>IRF6</i> a partir de DNA extraído de saliva total dos voluntários do estudo piloto	57
4.2 Análise Molecular – Preparação das amostras do grupo de estudo.....	58
4.2.1 Extração do DNA a partir da saliva total dos voluntários dos grupos estudados	58
4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do éxon 3 do gene <i>IRF6</i> no grupo de estudo	59
4.2.3 Eletroforese em gel de agarose para verificar amplificação do éxon 3 do gene <i>IRF6</i>	61
4.2.4 Purificação do produto de PCR.....	62
4.2.5 Reação de seqüenciamento.....	65
4.2.6 Purificação do produto da reação de seqüenciamento	67
4.2.7 Análise das seqüências.....	69
4.3 Casuística e Análise das seqüências para triagem de mutação nos grupos estudados	72
4.3.1 Casuística.....	72
4.3.2 Triagem de Mutação nas seqüências obtidas	72
5 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICES	93

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A fissura de lábio e palato, isolada ou não-sindrômica, é a mais comum dentre as malformações congênitas, com ocorrência de 1 para cada 700 nascidos vivos (RILEY et al., 2007), embora haja variação desses dados relacionada à localização geográfica e à condição sócioeconômica (SLAYTON et al., 2003; RILEY et al., 2007; JIA et al., 2009).

O desenvolvimento craniofacial, em linhas gerais, é um processo dinâmico, complexo e controlado geneticamente. Histologicamente, inicia-se com a proliferação e migração das células da crista neural, originárias do cérebro médio. A migração do segundo rombômero, também chamado de cauda, em conjunto com essas células, apresenta direcionamento para anterior no sentido de formar o primeiro arco branquial, que dará origem à face e suas estruturas, sendo este mecanismo determinado por alguns genes Homeobox (MURRAY, 1995; TEN CATE, 2001). Embriologicamente, ocorre proliferação da lâmina mesodérmica lateral reforçada pela migração das células da crista neural. De acordo com Ten Cate (2001), as estruturas da face se formam a partir da mesodermização dos cinco processos faciais (um processo frontonasal, dois processos maxilares e dois processos mandibulares), com conseqüente eliminação de sulcos entre eles. Quando ocorre deficiência ou falha nesse processo de mesodermização ou fusão (no caso do palato) dos processos faciais, por interrupção da regulação molecular, ocorre a malformação craniofacial.

Etiologicamente, a fissura labiopalatina apresenta um padrão de herança multifatorial, no qual é necessário haver interação de fatores genéticos e ambientais, interferindo na sinalização e na expressão molecular (MURRAY, 1995; SLAYTON et al., 2003; RILEY et al., 2007; JIA et al., 2009; TANG et al., 2009). Essa associação de fatores dificulta a identificação de genes específicos determinantes da anomalia.

A descoberta de genes responsáveis por síndromes nas quais as fissuras labiopalatinas fazem parte do quadro clínico tem permitido o entendimento da etiologia de sua forma mais comum, a não-sindrômica (KONDO et al., 2002; VIEIRA et al., 2007a). Estudos examinando o padrão de recorrência das fissuras não-

sindrômicas estimam que cerca de 3 a 14 genes possam estar envolvidos na determinação desse fenótipo (SCHLIEKELMAN; SLATKIN, 2002; RILEY et al., 2007; VIEIRA, 2008a). Estudos de ligação e associação têm indicado alguns genes candidatos, dentre eles: *TGFA*, *TGFB2*, *TGFB3*, *FGF*, *FOXE1*, *GLI2*, *JAG2*, *LHX8*, *SATB2*, *SKI*, *ERBB2*, *SPRY2*, *TBX10*, *MSX 2*, *MSX1* e *IRF6* (MURRAY, 1995; JEZEWSKI et al., 2003; BLANTON et al., 2005; VIEIRA et al., 2005; RAHIMOV et al., 2008; VIEIRA, 2008a; VIEIRA et al., 2008b; VIEIRA et al., 2008d; TANG et al., 2009; MARAZITA et al., 2009; JUGESSUR et al., 2009; SULL et al., 2009). No entanto, trabalhos que analisaram o seqüenciamento de amostras de DNA de indivíduos com fissura indicaram menor influência dos genes *MSX1*, *FOXE1*, *GLI2*, *MSX2*, *SKI* e *SPRY2*, considerados genes candidatos na etiologia das fissuras não-sindrômicas, sugerindo a possibilidade de interação gênica (VIEIRA et al., 2005; VIEIRA, 2008a). Estima-se que a participação do gene *MSX1* na ocorrência da fissura seja de 2%; a participação do gene *FGF*, de 5%, e a do gene *IRF6*, de 12% (ZUCCHERO et al., 2004; RILEY et al., 2007; VIEIRA, 2008a).

Em relação à cavidade bucal, os indivíduos acometidos pela fissura labiopalatina não-sindrômica apresentam características específicas. Dentre as particularidades odontológicas mais comuns encontram-se as alterações dentárias presentes tanto na dentadura decídua como na permanente com uma prevalência de 36% a 53% nesse grupo (LARSON et al., 1998; MONTANDON; DUARTE; FURTADO, 2001; VANZIN; YAMAZAKI, 2002; HELIOVAARA; RANTA; RAUTIO, 2004), ocorrendo com maior freqüência em indivíduos com fissura completa de lábio e palato. A agenesia dentária é a alteração de maior ocorrência na dentadura permanente, com prevalência variando de 16% a 46% em indivíduos com fissura em comparação com uma prevalência entre 1,5% e 10% na população geral, com exclusão das agenesias de 3^{os} molares (RANTA; STEGARS; RINTALA, 1983; LARSON; HELLQUIST; JAKOBSON, 1998; VASTARDIS, 2000; MONTANDON; DUARTE; FURTADO, 2001; HELIOVAARA; RANTA; RAUTIO, 2004; VIEIRA et al., 2007b; KÜCHLER et al., 2008).

A ausência congênita dos dentes é a anormalidade de desenvolvimento mais comum encontrada na população humana. Enquanto muito progresso tem ocorrido no sentido de entender as bases de desenvolvimento para a formação dentária, as bases etiológicas para a ocorrência da agenesia são ainda pouco conhecidas

(COBOURNE, 2007). Vastardis (2000) descreve em seu estudo algumas das teorias para explicar a ocorrência dessa anomalia. Uma dessas teorias foi proposta por Clayton (1956 apud VASTARDIS, 2000), em estudo clínico realizado com humanos sugerindo que os últimos dentes de cada série seriam os mais acometidos por essa alteração dentária, ou seja, o incisivo lateral para o grupo de incisivos, o segundo pré-molar para o grupo de pré-molares e os terceiros molares para o grupo dos molares. A explicação para tal ocorrência seria de que esses dentes mais acometidos representariam órgãos vestigiais com pequena utilização pelo homem moderno, além de que no processo evolucionário esses dentes não representariam uma vantagem seletiva para a espécie.

Outra teoria interessante também relatada por Vastardis (2000) é a de Svinhufvud e colaboradores (1988 apud VASTARDIS, 2000), que justificam a agenesia em termos anatômicos, sugerindo que certas regiões durante o desenvolvimento dentário, ou seja, áreas de fusão embrionária, seriam mais suscetíveis a influências epigenéticas. A terceira teoria, proposta por Kjaer e colaboradores (1997 apud VASTARDIS, 2000), supõe que nesses locais de fusão embrionária a inervação ocorre por último, o que também poderia prejudicar a formação dentária por causar uma diversidade no microambiente. Estas duas últimas teorias oferecem subsídio para a afirmação de Vastardis (2000) de que o desenvolvimento dentário normal é particularmente sensível a defeitos no desenvolvimento craniofacial, pois distúrbios no mesênquima embrionário são freqüentemente associados a defeitos dentários, característica altamente prevalente entre indivíduos com fissura labiopalatina.

Assim como no desenvolvimento craniofacial, a formação dentária é decorrente de interações complexas entre os tecidos embrionários e requer regulação precisa do movimento celular, crescimento, modelamento e diferenciação dos tecidos. Para que haja todo esse processo de formação dentária estão envolvidos mais de 300 genes que atuam como reguladores na transcrição de outros genes e estão envolvidos em interações genéticas com expressão espacial e temporal específicas (VIEIRA, 2003; THESLEFF, 2006; KAPADIA et al., 2007). Interferências na sinalização ou expressão desses genes pode impedir a formação do germe dentário, o que é classificado como agenesia dentária. Alguns autores acreditam, inclusive, que alterações de genes independentes possam causar a

agenesia dentária (VIEIRA, 2003). Analisando dessa forma, teoricamente alterações nos genes envolvidos na sinalização inicial para a formação dentária seriam candidatos em potencial para influenciar a ocorrência de tal anomalia. (THESLEFF, 2006)

Os estudos genéticos com modelos animais têm mostrado um grande número de genes candidatos para a agenesia dentária, mas, até o momento, mutações em somente três desses genes, o *MSX1*, o *PAX9* e o *AXIN2*, têm sido identificadas em famílias com hipodontia ou oligodontia (STOCKTON et al., 2000; DAS et al., 2002; ZHAO et al., 2005; PERES et al., 2005; KAPADIA; MUES; D'SOUZA, 2006; LAMMI et al., 2006; COBOURNE, 2007; HU; SIMMER, 2007; MATALOVA et al., 2008). De acordo com Cobourne (2007), esses achados sugerem que essa característica de agenesia dentária pode representar uma condição com uma etiologia multifatorial mais complexa, influenciada pela combinação da função do gene, interação ambiental e período do desenvolvimento.

Recentemente, o gene *IRF6*, cuja mutação pode determinar a síndrome de van der Woude e é responsável por 12% das fissuras orais não-sindrômicas (PARANAÍBA et al., 2008; ZUCCHERO et al., 2004), também foi considerado gene candidato à agenesia dentária isolada (VIEIRA, 2008a).

Embriologicamente, mecanismos semelhantes ocorrem no desenvolvimento dos dentes, do lábio e do palato. Por esse motivo, possivelmente haja relação entre a presença da fissura labiopalatina e a constatação de agenesias dentárias. Estudos com embriões de modelos animais detectaram alta expressão do gene *irf6* durante o período de formação do palato (KONDO et al., 2002). Outros autores relataram que o gene *Irf6* é essencial para a diferenciação do epitélio oral e, além disso, participa na determinação de uma adequada adesão epitelial para a formação do palato (RICHARDSON et al., 2009). Nas avaliações genéticas com humanos, ao verificar que mutações no gene *IRF6* causam as síndromes de van der Woude e pterígeo poplíteo, Kondo e colaboradores também relataram que o gene *IRF6* é essencial para o desenvolvimento do lábio e do palato, além de outros órgãos. Segundo Jia e colaboradores (2009), o gene *IRF6* é considerado elemento “chave” no desenvolvimento oral e maxilofacial.

Outros estudos têm demonstrado expressão dos genes *MSX1* e *IRF6* na lâmina dentária na 8ª semana de vida intra-uterina, sugerindo envolvimento destes também durante o desenvolvimento dentário (VIEIRA et al., 2004; VIEIRA et al., 2007b). Alguns pesquisadores têm analisado genes candidatos à fissura e têm encontrado forte relação desses genes com a agenesia dentária, destacando-se os genes *MSX1* e o *IRF6* (VIEIRA et al., 2004; THESLEFF, 2006; VIEIRA et al., 2007b; VIEIRA, 2008a).

O estudo de populações tem mostrado que tanto a agenesia dentária como a fissura labiopalatina são características que podem se manifestar de maneira isolada ou como parte de síndromes (NIEMINEN et al., 2003; GHASSIBÉ et al., 2005; COBOURNE, 2007). A forma isolada pode estar relacionada a uma herança familiar e para esses casos existem especulações na literatura a respeito de um modelo poligênico para esse fenótipo, uma vez que diferentes genes associados ou isolados podem estar envolvidos na manifestação desses fenótipos de modo isolado ou mesmo associados entre si (VASTARDIS, 2000, VAN DEN BOOGAARD et al., 2000; VIEIRA et al., 2007a; VIEIRA et al., 2007b; VIEIRA, 2008a).

Ao cruzar os dois fenótipos (agenesia dentária e fissura labiopalatina), que formam a base dos objetivos iniciais desta tese, encontra-se muito citado na literatura o gene *IRF6*.

O conhecimento da etiologia genética desses dois fenótipos constitui o primeiro passo para o aconselhamento genético. Em um segundo momento, por meio de terapia gênica, talvez seja possível minimizar os efeitos dessas alterações decorrentes das proteínas alteradas dos genes envolvidos. Certamente essas proteínas, produtos de genes com variações em suas seqüências de nucleotídeos, não influenciaram somente a ocorrência das malformações craniofaciais e dentárias em fases precoces do período embrionário, mas também outras funções durante toda a vida do indivíduo afetado.

Estudos científicos recentes avaliando indivíduos com fissura labiopalatina na idade adulta relataram alta prevalência de desordens psiquiátricas e aumento na ocorrência de câncer de mama e de cérebro (BILLE et al., 2005; NOPOULOS et al., 2007; VIEIRA, 2008a). Esses resultados reforçam a importância da pesquisa dos

genes envolvidos na etiologia da fissura, uma vez que a partir desse conhecimento provavelmente sejam possíveis estratégias para a prevenção dessas graves patologias de manifestação tardia.

Em relação à metodologia para essas análises, o seqüenciamento direto de DNA, associado ou não a outras metodologias, sem dúvida tem sido o método de eleição (PEGELow et al., 2008; PARANAÍBA et al., 2008; TANG et al., 2009; JIA et al., 2009; PARANAÍBA et al., 2009). A maioria dos protocolos até então sugeridos e adotados são unânimes em utilizar o sangue como material de partida para a extração de DNA (BLANTON et al., 2005; SRICHOMTHONG; SIRIWAN; SHOTELERSUK, 2005; GHASSIBÉ et al., 2005; AIDAR; LINE, 2007; JAKOBSEN et al., 2007; PEGELow et al., 2008; BIRNBAUM et al., 2008; SUAZO et al., 2008; TANG et al., 2009; JIA et al., 2009). Entretanto, a obtenção desse fluido pode por vezes inviabilizar as pesquisas, pois dependendo da faixa etária do grupo a ser estudado os indivíduos podem se negar a participar em virtude da necessidade de um procedimento invasivo para a coleta do material (AIDAR; LINE, 2007).

Por outro lado, como a saliva é facilmente obtida por meio de coleta não-invasiva, a aceitação dos voluntários em participar dos estudos é maior. Além disso, alguns autores relataram resultados semelhantes na quantidade e na qualidade de DNA extraído de saliva comparado ao obtido de sangue (AIDAR; LINE, 2007).

São poucos os relatos da literatura sobre a utilização de saliva para obtenção de DNA para PCR e seqüenciamento direto de DNA (AIDAR; LINE, 2007; PARANAÍBA et al., 2009). Os trabalhos publicados utilizando tanto sangue como saliva não descrevem detalhadamente os protocolos seguidos para preparação das amostras para o seqüenciamento (PARDO; CASTILLO; VIEIRA, 2006; PEGELow et al., 2008; TANG et al., 2009; JIA et al., 2009). Assim, existem vários protocolos sendo utilizados nos diversos centros de pesquisa que investigam o genoma, mas nenhum deles publicou discussões sobre as etapas de preparação das amostras para o seqüenciamento. A publicação de resultados negativos e a discussão ou busca de explicações para esses achados possibilita à comunidade científica uma discussão extremamente positiva no sentido de determinar alternativas aos protocolos para a resolução de possíveis intercorrências. O objetivo em torno dessa

discussão é viabilizar um protocolo que possa otimizar os resultados para seqüenciamento direto de DNA genômico extraído a partir de amostras de saliva.

Para que investigações dessa natureza possam ser realizadas por outros pesquisadores, é necessário padronizar um protocolo para o seqüenciamento direto de DNA genômico a partir de saliva, testando as diferentes possibilidades de reagentes e protocolos para cada fase de preparação das amostras até o seqüenciamento direto do DNA genômico na plataforma ABI 3130 (Applied Biosystems).

A padronização do protocolo, realizada nesta tese, para o seqüenciamento direto de DNA genômico, extraído a partir de saliva, será utilizada no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Bauru para utilização do Seqüenciador ABI 3130 XL. Isso viabilizará diversas pesquisas envolvendo as áreas de Genética, Odontologia e Fonoaudiologia, uma vez que o material de partida proposto é a saliva, fluido pouco utilizado para estudos genéticos em outras áreas e facilmente obtido na clínica odontológica.

1.1 O gene *IRF6*

Membro de uma família de nove fatores reguladores de transcrição, esse gene é composto por dez éxons, sendo os éxons 3, 4, 5, 6, 7, 8 e parte do 9 responsáveis pela região codificadora. A proteína resultante é composta por dois domínios: um que se liga ao DNA e o outro a proteínas. Alguns dos *IRFs* atuam na regulação da expressão do interferon- α e - β após infecção viral (OMIM), diretamente ligados aos mecanismos de defesa (TANIGUCHI et al., 2001; JIA et al., 2009). O *IFR4* está envolvido no desenvolvimento hematopoiético (PAUN; PITHA, 2007). Alguns estudos identificaram relação dos *IRF1* e *IRF2* com a patogênese do câncer, atuando como supressores tumorais e oncogenes (TAMURA et al., 2008; TAKAOKA et al., 2008). Bailey e colaboradores (2008) verificaram expressão reduzida ou ausente do *IRF6* em tumores de mama, o que sugere uma provável propriedade ou função supressora de tumor para esse gene. Além disso, alguns autores relatam que o *IRF1* pode ter alguma ação no ciclo celular agindo como pró-apoptótico ou anti-apoptótico (CHAPMAN et al., 2000).

Estudos em modelos animais mostraram altos níveis de RNA mensageiro (RNA_m) do *Irf6* ao longo da linha média de fusão do palato, germes dentários, folículos, genitália e pele (KONDO et al., 2002). Esses mesmos autores demonstraram ainda que a haploinsuficiência do *Irf6* causa distúrbios do desenvolvimento orofacial (KONDO et al., 2002). Outros estudos em camundongos e aves encontraram expressão do gene *Irf6* na fusão do tecido ectodérmico durante a formação do lábio superior e do palato primário, mas verificaram sua expressão no desenvolvimento do palato secundário somente em camundongos, cujo mecanismo de fusão do palato é semelhante ao dos humanos (WASHBOURNE; COX, 2006; KNIGHT et al., 2006). Um padrão de expressão semelhante para esse gene é também citado na estrutura craniofacial humana, embora a função embriológica do *IRF6* no desenvolvimento do lábio e do palato em humanos ainda permaneça desconhecida (BAILEY et al., 2008; JIA et al., 2009).

Outro grupo de pesquisadores verificou que animais deficientes do gene *Irf6* apresentaram anormalidades no desenvolvimento craniofacial, na pele e em membros (INGRAHAM et al., 2006). Em humanos, Vieira e colaboradores (2007) relataram que de acordo com o projeto COGENE (<http://hg.wustl.edu/COGENE/>), o gene *IRF6* se expressa na mandíbula durante a 6^a semana de gestação e na lâmina dentária na oitava semana e meia de gestação (VIEIRA et al., 2007b).

Mutações heterozigotas no gene *IRF6* causam as síndromes de van der Woude (OMIM 119300) e pterígeo poplíteo (OMIM 119500), as quais são condições que clinicamente podem cursar com a fissura de lábio e palato em sua forma isolada (KONDO et al., 2002; VIEIRA, 2008a; PARANAÍBA et al., 2008). A forma mais comum de fissura sindrômica é a síndrome de van der Woude, cuja característica clínica é a fissura labiopalatina associada a fístulas no lábio inferior (em 85% dos casos) e agenesias dentárias (em 25% dos casos) (GHASSIBÉ et al., 2005; PARANAÍBA et al., 2008). Estudos relataram que dentro de um espectro de fenótipos diferentes desencadeados por mutações ou polimorfismos no gene *IRF6*, encontram-se de um lado as síndromes na forma mais grave (1 para 100.000 a 200.000 nascidos vivos) e de outro a agenesia dentária isolada como uma possível manifestação mais branda da alteração no gene (1 para 10 a 100 nascidos vivos). Em nível intermediário deste espectro poderia ocorrer a fissura labiopalatina isolada (1 para 500 a 2000 nascidos vivos), associada ou não, à agenesia dentária

(ZUCCHERO et al., 2004; RILEY et al., 2007; VIEIRA et al., 2007a; VIEIRA et al., 2007b; PEGELOW et al., 2008; VIEIRA et al., 2008b).

Estudos recentes avaliando polimorfismos simples de nucleotídeos (SNPs) no gene *IRF6* em indivíduos com fissura e seus familiares, em diferentes populações, têm encontrado forte relação entre esses polimorfismos e a fissura de lábio e palato não-sindrômica, confirmando significativa associação entre o gene *IRF6* e a ocorrência de fissura de lábio e /ou palato não-sindrômica. (KONDO et al., 2002; ZUCCHERO et al., 2004; GHASSIBÉ et al., 2005; SCAPOLI et al. 2005; SRICHOMTHONG; SIRIWAN; SHOTELERSUK, 2005; BLANTON et al., 2005; RILEY et al., 2007; SUAZO et al., 2008; TANG et al., 2009; JIA et al., 2009). Zuccherro e colaboradores (2002), em um extenso estudo com diversas populações, testaram o SNP V274I (substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 274 do gene *IRF6*) em 8003 indivíduos dos quais 6755 eram membros de famílias em que havia pelo menos um indivíduo com fissura. Os autores encontraram uma forte evidência de transmissão do alelo valina causando a fissura de lábio e palato.

De acordo com Vieira (2008), a investigação do gene *IRF6*, que até o momento é o maior contribuidor (12%) para as fissuras de lábio e palato não-sindrômicas, possibilita a identificação de outros genes ligados a essa malformação. Da mesma forma, trabalhos investigando a etiologia genética das agenesias dentárias também sugerem possível interação entre o *IRF6* e outros genes que podem ser relevantes para a fissura de lábio e/ou palato.

Nesta tese, a escolha do éxon 3 para o estudo inicial da triagem de mutação nesse gene, deve-se ao fato de que nos éxons 3 e 4 encontra-se um domínio conservado de ligação ao DNA. Além disso, alguns trabalhos têm relacionado os éxons 3, 4 e 7 às principais e mais importantes mutações relacionadas à fissura não-sindrômica (KONDO et al., 2002; BJORK et al., 2006; BIRNBAUM et al., 2008; VIEIRA et al., 2008d; JEHEE et al., 2009).

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Relatos da literatura sugerem que o gene *IRF6* participa tanto da etiologia das fissuras labiopalatinas não-sindrômicas como da agenesia dentária. Uma das dificuldades para estudos nesta área é o recrutamento de pacientes com fissuras labiopalatinas. O Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC/USP) possui um número muito elevado de pacientes fissurados matriculados, sendo referência mundial na área. Levando-se em conta que a etiologia genética das agenesias dentárias e das fissuras labiopalatinas ainda não está completamente estabelecida, propõe-se nesse trabalho investigar, em pacientes do HRAC/USP e demais voluntários, se alterações no éxon 3 do gene *IRF6* estão associadas aos fenótipos “fissura labiopalatina” e “agenesia dentária”. A partir desse estudo inicial propõe-se também padronizar um protocolo, na plataforma ABI 3130 XL (Applied Biosystems), para seqüenciamento direto de DNA genômico extraído a partir de saliva total, a ser utilizado futuramente no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

Desta forma, este estudo contribuirá para o esclarecimento da etiologia das fissuras labiopalatinas, das agenesias dentárias e na orientação genética, além de viabilizar muitas outras pesquisas genéticas na área odontológica por abreviar o tempo para processamento das amostras, eliminando a necessidade de novas padronizações com vantagens importantes na relação custo-benefício de estudos futuros. Adicionalmente, os resultados possibilitarão no futuro um melhor tratamento dos indivíduos com esses fenótipos, tendo em vista que estudos recentes têm relatado que portadores de fissura labiopalatina apresentam risco aumentado de desenvolvimento de alguns tipos de câncer, permitindo provavelmente uma abordagem preventiva para essas manifestações tardias dessas alterações genéticas.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

- Realizar seqüenciamento direto do éxon 3 do gene *IRF6*.

2.2 Objetivos específicos

- Triar variações nas seqüências de nucleotídeos (polimorfismos e mutações) no éxon 3 do gene *IRF6* em indivíduos com fissura labiopalatina não-sindrômica e agenesia dentária.
- Padronizar um protocolo para, no analisador genético ABI 3130 XL, realizar seqüenciamento direto de DNA genômico extraído a partir de amostras de saliva total.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O Comitê de Ética do HRAC/USP aprovou o projeto desta tese, conforme protocolo N° 183/2008.

3.1 Casuística

Fizeram parte do estudo 120 indivíduos divididos nos seguintes grupos:

Grupo 1 – 30 indivíduos com fissura completa de lábio e palato unilateral não-sindrômica e agenesia dentária, verificada por radiografia e histórico odontológico, regularmente matriculados no HRAC/USP. Na análise de agenesia foram excluídas as agenesias de terceiros molares e dentes na área da fissura. Vale ressaltar que foram excluídos os terceiros molares por se tratar de uma característica específica adaptativa da espécie humana. A exclusão de agenesia na área da fissura também se justifica porque essa alteração pode estar relacionada ao próprio defeito anatômico da fissura, ocasionando agenesia. Foram selecionados preferencialmente pacientes com agenesias de dentes permanentes contralaterais à fissura ou pré-molares independentemente do arco. Essa agenesia foi de pelo menos um dente e no máximo quatro dentes, uma vez que a ausência de mais de quatro dentes pode ser característica de alguma síndrome (MOSTOWSKA; KOBIELAK; TRZECIAK, 2003). Todos esses pacientes foram previamente selecionados pela doutoranda Lucimara Teixeira das Neves (n° USP 1088831), cirurgiã-dentista do Setor de Odontopediatria do HRCA/USP. Para esta seleção, foram analisados cerca de 300 prontuários e avaliados as radiografias ortopantomográficas (panorâmicas) e os respectivos laudos realizados pelo Setor de Radiologia do HRAC/USP. Vale ressaltar que para a confirmação radiográfica da agenesia, foram avaliadas pelo menos duas radiografias ortopantomográficas em idades distintas. Quando confirmados a

agenesia dentária e o tipo de fissura não-sindrômica, os pacientes foram convidados a participar do estudo em data agendada para o retorno ao HRAC/USP.

Grupo 2 – 30 indivíduos somente com fissura completa de lábio e palato unilateral não-sindrômica, regularmente matriculados no HRAC/USP, sem nenhuma agenesia dentária, que compareceram para consultas de rotina. Para esta seleção, a doutoranda analisou cerca de 300 prontuários e avaliou as radiografias ortopantomográficas (panorâmicas) e os laudos respectivos realizados pelo Setor de Radiologia do HRAC/USP, confirmando a presença de todos os dentes e o diagnóstico de fissura unilateral completa não-sindrômica.

Grupo 3 – 30 indivíduos somente com algum tipo de agenesia dentária (preferencialmente de pré-molares para que fossem equiparados às características odontológicas do grupo 1. Esse grupo foi constituído por voluntários selecionados entre os estudantes de graduação e pós-graduação dos cursos de Odontologia e Fonoaudiologia da FOB/USP e entre os pacientes dos cursos de especialização em Ortodontia da Profis (Sociedade de Promoção social do fissurado lábio-palatal) e Uningá (Unidade de Ensino Superior Ingá) na cidade de Bauru. Todas as agenesias foram constatadas clínica e radiograficamente, porém em alguns pacientes elas foram diagnosticadas por outro cirurgião-dentista que não a doutoranda.

Grupo 4 (Controle) – 30 indivíduos sem fissura e sem agenesia dentária, alunos dos cursos de graduação e pós-graduação de Odontologia e Fonoaudiologia da FOB/USP e do HRAC/USP, além de funcionários não-docentes da FOB/USP e do HRAC/USP.

A triagem de todos os voluntários e a coleta de saliva dos mesmos foi realizada pela doutoranda no Laboratório de Farmacologia da FOB/USP. No caso dos pacientes selecionados no HRAC/USP, o convite e a coleta da saliva foram

realizados também pela doutoranda na ocasião em que os indivíduos compareceram para consultas de rotina ao HRAC/USP em uma sala destinada para tal. A todos os indivíduos selecionados de acordo com os critérios acima descritos e convidados a participar do estudo, foi explicado pela pesquisadora o objetivo do trabalho com leitura minuciosa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os voluntários que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 Métodos - Análise Molecular

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório da Disciplina de Farmacologia, do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos. A coleta salivar e as análises moleculares foram realizadas pela doutoranda Lucimara Teixeira das Neves, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos com a colaboração da Prof^ª Dr^ª Roseli Maria Zechi Ceide (Fundação para o estudo e tratamento das Deformidades Craniofaciais –FUNCRAF/HRAC) e do técnico do laboratório Thiago José Dionísio (n^º USP 4305995).

3.2.1 Estudo piloto

Essa fase do estudo consistiu na coleta de sangue periférico, saliva não estimulada e esfregaço de bochecha (*swab*) de um grupo de voluntários com o objetivo de comparar os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene constitutivo da β -actina a partir do DNA obtido destes três fluidos.

Para extração de DNA de saliva e *swab* foi utilizado o protocolo com o produto InstaGeneTM Matrix (732-6030, Bio-rad, Estados Unidos) diluído em água (1:1) (SAKAI et al., 2007). Para a extração de DNA a partir de sangue periférico foi utilizado o kit comercial de extração Puregene DNA purification KIT (158386, Gentra, Estados Unidos) seguindo a recomendação do fabricante.

Com o DNA obtido destes três fluidos, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) para a β -actina (gene constitutivo humano), utilizando-se os

primers e condições de reação já estabelecidos previamente no Laboratório de Farmacologia da FOB/USP (Santos et al., 2002), com o objetivo de verificar a presença ou não de DNA na reação (presença ou ausência de banda no gel de agarose corado com brometo de etídeo e exposto à luz ultravioleta). Para quantificar o DNA obtido de cada fluido, essas amostras foram analisadas em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Após a verificação da viabilidade de uso do DNA extraído tanto da saliva como também extraído de sangue e *swab*, para amplificação do gene da β -actina, optou-se em utilizar como material de partida o DNA extraído a partir de saliva. Esse foi o material utilizado como partida para a padronização das condições da PCR para amplificação do éxon 3 do gene *IRF6*.

Cada um dos passos e técnicas empregadas no estudo piloto serão descritos a seguir, quando será detalhado todo o processamento das amostras dos grupos de estudo desta tese.

3.2.2 Coleta e preparação das amostras dos grupos de estudo para seqüenciamento

3.2.2.1 Coleta de saliva

Os pacientes receberam um béquer de vidro estéril para a coleta de saliva total expectorada até a marcação de 5 mL. Do béquer, foi pipetado o volume total e a saliva foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL identificado. Este, por sua vez, foi acondicionado em gelo picado para ser transportado até o Laboratório da Disciplina de Farmacologia, do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP. Chegando ao Laboratório, todos os tubos foram imediatamente estocados em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA.

3.2.2.2 Extração de DNA genômico das amostras de saliva

Os tubos contendo as amostras estocadas de saliva foram descongelados em temperatura ambiente e homogeneizados em agitador (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil).

Para cada uma das amostras, foram pipetados aproximadamente 1 mL da saliva de cada voluntário estocada no tubo Falcon, os quais foram transferidos para um tubo de microcentrifuga estéril de 2 mL devidamente identificado. Essas amostras foram submetidas à extração de DNA conforme descrito abaixo:

PROTOCOLO 1 - EXTRAÇÃO DE DNA DE SALIVA InstaGene™ Matrix (InstaGene Matrix diluído em água – 1:1)

A - Lavagem das células

- 1) Agitar os tubos contendo 1 mL de saliva no vórtex para diluição uniforme do conteúdo
- 2) Acrescentar 1 mL de soro fisiológico no mesmo tubo.
- 3) Agitar o tubo no vórtex (30 segundos)
- 4) Centrifugar a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C
- 5) Descartar o sobrenadante
- 6) Repetir os procedimentos de 2 a 5 por mais 2 vezes

B – Remoção de resíduos que podem interferir no resultado da PCR, ruptura da membrana celular e precipitação de resíduos

- 7) Acrescentar 100 µL de água livre de DNAase e RNAase e 100 µL de InstaGene™ Matrix
- 8) Agitar o tubo no vórtex até que o precipitado se dissolva (30 segundos)
- 9) Incubar a 56°C por 30 minutos
- 10) Agitar o tubo no vórtex em velocidade máxima por 10 segundos
- 11) Ferver os tubos em 100°C por 10 minutos
- 12) Agitar o tubo no vórtex em velocidade máxima por 10 segundos
- 13) Centrifugar a 15.000 g durante 5 minutos a 4°C

C - Coleta do DNA

- 14) Pipetar o sobrenadante, pois aí se encontra o DNA extraído. Cuidado deve ser tomado para não pipetar o precipitado localizado no fundo do tubo, nem o líquido turvo próximo do precipitado, pois nesse local se encontram os restos de células, organelas e proteínas. O rendimento em volume desse protocolo é por volta de 150 µL de solução de DNA.

Para as amostras em que não foi observada banda de tamanho esperado após a realização de PCR para o éxon 3 do gene *IRF6*, foram testados dois outros protocolos de extração de DNA, conforme descrição a seguir.

PROTOCOLO 2 - EXTRAÇÃO DE DNA DE SALIVA InstaGene™ Matrix (sem diluição)

As únicas diferenças do protocolo 1 em relação ao 2 são quanto à quantidade de saliva total como material de partida (1,5 mL), e quanto ao volume de InstaGene Matrix utilizado.

A - Lavagem das células

- 1) Agitar os tubos contendo 1,5 mL de saliva no vórtex para diluição uniforme do conteúdo
- 2) Centrifugar a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C
- 3) Descartar o sobrenadante
- 4) Acrescentar 1 mL de soro fisiológico no mesmo tubo.
- 5) Agitar o tubo no vórtex até que o precipitado de células no fundo do tubo se dissolva e a partir desse momento cronometrar os 30 segundos
- 6) Centrifugar a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C
- 7) Descartar o sobrenadante
- 8) Repetir os procedimentos de 4 a 7 por mais 2 vezes

B – Remoção de resíduos que podem interferir no resultado da PCR, ruptura da membrana celular e precipitação de resíduos

- 9) Acrescentar 200 µL de InstaGene Matrix
- 10) Agitar o tubo no vórtex até que o precipitado se dissolva (30 segundos)
- 11) Incubar a 56°C por 30 minutos

- 12) Agitar o tubo no vórtex em velocidade máxima por 10 segundos
- 13) Ferver os tubos em 100°C por 10 minutos
- 14) Agitar o tubo no vórtex em velocidade máxima por 10 segundos
- 15) Centrifugar a 15.000 g durante 5 minutos a 4°C

C - Coleta do DNA

16) Pipetar o sobrenadante, pois aí se encontra o DNA extraído. Cuidado para não pipetar o precipitado no fundo do tubo, nem líquido turvo próximo do precipitado, pois nesse local se encontram os restos de células, organelas e proteínas. O rendimento em volume desse protocolo é por volta de 150 µL de solução de DNA.

PROTOCOLO 3 - EXTRAÇÃO DE DNA DE SALIVA InstaGene™ Matrix (InstaGene™ Matrix diluído 1:1) associado à Proteinase K (número de catálogo 25530-015, Invitrogen, Estados Unidos) e dodecil sulfato de sódio (SDS, 1%).

As diferenças do protocolo 3 em relação ao 2 são quanto à adição de proteinase K para descartar contaminação de proteínas no DNA extraído e à diluição do InstaGene™ Matrix.

A - Lavagem das células

- 1) Agitar os tubos contendo 1,5 mL de saliva no vórtex para diluição uniforme do conteúdo
- 2) Centrifugar a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C
- 3) Descartar o sobrenadante
- 4) Acrescentar 1 mL de soro fisiológico no mesmo tubo.
- 5) Agitar o tubo no vórtex até que o precipitado de células no fundo do tubo se dissolva e a partir desse momento cronometrar os 30 segundos
- 6) Centrifugar a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C
- 7) Descartar o sobrenadante
- 8) Repetir os procedimentos de 4 a 7 por mais 2 vezes

B - Remoção de resíduos que podem interferir no resultado da PCR, ruptura da membrana celular e precipitação de resíduos

- 9) Acrescentar 100 µL de água livre de DNAase e RNAase e 100 µL do InstaGene (1:1)
- 10) Agitar o tubo no vórtex até que o precipitado se dissolva (30 segundos)
- 11) Incubar a 56°C por 30 minutos
- 12) Agitar o tubo no vórtex em velocidade máxima por 10 segundos
- 13) Ferver os tubos em 100°C por 10 minutos
- 14) Agitar o tubo no vórtex em velocidade máxima por 10 segundos
- 15) Acrescentar 2 µL de Proteinase K (40 µg) e 2 µl de SDS 1%
- 16) Agitar o tubo no vórtex
- 17) Incubar a 65°C por 30 minutos (a cada 10 minutos agitar os tubos mergulhados na água)
- 18) Agitar o tubo no vórtex em velocidade máxima por 10 segundos
- 19) Centrifugar a 15.000 rpm durante 5 minutos a 4°C

C - Coleta do DNA

20) Pipetar o sobrenadante, pois aí se encontra o DNA extraído. Cuidado para não pipetar o precipitado no fundo do tubo, nem líquido turvo próximo do precipitado, pois nesse local se encontram os restos de células, organelas e proteínas. O rendimento em volume desse protocolo é por volta de 150 µL de solução de DNA.

O objetivo principal dessa etapa foi obter, por meio do protocolo de extração escolhido, a maior concentração de DNA possível e com a melhor qualidade. O principal intuito foi o de obter o maior rendimento possível e para tanto foram testados os três protocolos de extração de DNA descritos.

3.2.2.3 Quantificação do DNA extraído da saliva

A quantificação do DNA obtido de todas as amostras foi realizada por meio de leitura em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 260 e 280 nm (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific), conforme descrição do estudo piloto. Esse

equipamento fornece duas medidas importantes: concentração e qualidade do DNA. Os valores referentes à concentração são expressos em ng/ μ L, e para a aferição realizada no espectrofotômetro são necessários de 1,5 μ L a 2,0 μ L de cada amostra. Os valores referentes à qualidade são expressos por meio da relação das absorvâncias em 260 nm e 280 nm.

3.2.2.4 Diluição das amostras de DNA para PCR

Com base nos resultados do estudo piloto, padronizou-se a quantidade inicial de DNA para a PCR em 500 ng. Após a adequada diluição, as amostras de DNA foram armazenadas em freezer -20°C para serem utilizadas ao longo do estudo.

3.2.2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As triagens de mutação no éxon 3 do gene *IRF6* foram realizadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e seqüenciamento direto da região codificadora incluindo regiões de *splice*.

Os *primers* para a reação de PCR do éxon 3 do gene *IRF6*, os quais contêm a seqüência codificadora, foram desenhados com base em seqüências publicadas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), utilizando-se o programa Primer3 (<http://www.frodo.wi.mit.edu/primer3>). A confirmação da especificidade dos *primers* desenhados foi realizada por meio de consulta na base de dados Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Cada *primer* foi desenhado de maneira a flanquear o éxon antes do início do mesmo (Figura 1). As seqüências dos *primers* forward (senso) e reverse (anti-senso) foram, respectivamente: 5' AGCTCTAGTAGATGGGAAAGGTG-3' e 5'CCAGAAAGGTCTGATGGTAGAAG-3'.

ACCTTTTAACCTCTTTTCTTTCCCACCTGGCACAGCTTATTCCCATATTTAGTTTC
 TTTGCTGTAATCTAGTGAAACTGTAGCTCTAGTAGATGGGAAAGGTGGCTGGGA
 AGGGTTCCCAGTGGCTGGCCTAATTCTTCTGCTCTTCCCATTCTCCCTCTGAC
 CCCCCAGATCATGGCCCTCCACCCCGCAGAGTCCGGCTAAAGCCCTGGCTG
 GTGGCCAGGTGGATAGTGGCCTCTACCCTGGGCTCATCTGGCTACACAGGGA
 CTCTAAACGCTTCCAGATTCCCTGGAAACATGCCACCCGGCATAGCCCTCAACA
 AGAAGAGGAAAATACCATTTTTAAGGTAAAGGACTTCTTCTACCATCAGACCTTT
 CTGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATGGGGAATACACTAGATCTAAAACCTCT
 GGTGAAACAGAGAGAATGCTTATGATGGGGGTGCCCAAAC

Figura 1 - *Primers* (em amarelo) desenhados para o fragmento correspondente ao éxon 3 (representado em cinza) do gene *IRF6* para amplificação por meio da PCR, gerando um produto de 302 pb

O cálculo da temperatura de anelamento do *primer* foi realizado levando-se em conta os pares de bases (pb) que compõem os *primers*, por meio da fórmula: Temperatura de anelamento = (A+T) x 2 + (C+G) x 4. Essa fórmula foi usada para cada uma das fitas *forward* (*sense*) e *reverse* (*anti-sense*) separadamente e então realizada a média aritmética.

O éxon 3 do gene *IRF6* foi amplificado por meio de PCR realizada em um volume final de 50 µL, conforme Figura 2 a seguir (kit de PCR, número de catálogo 11615-010, Invitrogen, Estados Unidos):

PRODUTO	VOLUME PIPETADO (µL)	Concentração final (1 reação)
Tampão (10X)	5,0 µL	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µL	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	1,0 µL	0,2 mM
<i>Primers</i> Forward e Reverse (20 µM)	1,5 µL	0,6 µM cada
Taq Polimerase (5 unidades/µL)	0,5 µL	2,5 unidades
DNA (50 ng/ µL)	10,0 µL	500 ng
Água livre de DNase e RNase	29,0 µL	-

Figura 2 – Esquema contendo os reagentes, as concentrações e as quantidades utilizadas na reação de amplificação por PCR para o éxon 3 do gene *IRF6*

O processo de ciclagem térmica, realizado em termociclador (Thermo Electron Corporation – PxE0.5, Estados Unidos), consistiu de desnaturação inicial por 4 min a 95°C seguida de 40 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de desnaturação por 30 s a 95°C, anelamento por 30 s a 63°C e extensão por 1 min a 72°C. As amostras foram incubadas por um período adicional de 7 min a 72°C e mantidas em 4°C até o momento da retirada do aparelho.

3.2.2.6 Eletroforese em gel de agarose para verificar amplificação do éxon 3 do gene *IRF6*

Para a confirmação da amplificação do fragmento desejado do éxon 3 do gene *IRF6* foram utilizados 10 µL do produto da PCR de todas as amostras misturados ao tampão da amostra (azul de bromofenol 0,025% em sacarose 4%) e corridos em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (0,64 µg/mL). A eletroforese foi realizada em cuba para sistema horizontal de eletroforese LCH 13x15 (Loccus Biotecnologia, Brasil) alimentada por fonte de eletroforese (Loccus Biotecnologia modelo LPS 300, Brasil) nas seguintes condições: 100 V por 45 minutos.

Foram considerados amplificados os produtos das amostras que apresentassem sinal positivo de bandas observadas quando da exposição do gel em luz ultravioleta, pela comparação com um marcador de peso molecular, na região de 300 pb, pois o tamanho do fragmento do éxon 3 do gene *IRF6*, com os *primers* utilizados na PCR, é de 302 pb.

Nas amostras em que não houve constatação de banda foi repetida a reação de PCR com uma quantidade aumentada de DNA (por volta de 1 µg).

3.2.2.7 Purificação do produto da PCR

Neste estudo, para o estabelecimento do protocolo para seqüenciamento direto de DNA genômico na plataforma ABI 3130 XL foram avaliados dois protocolos

para purificação de produto de PCR: 1) purificação por colunas Qiaquick – PCR Purification kit (número de catálogo 28106, Qiagen, Estados Unidos) e 2) por sistema enzimático ExoSAP-IT[®] (número de catálogo 78200, USB, Estados Unidos), conforme as recomendações dos fabricantes seguindo os protocolos descritos a seguir.

Protocolo para purificação de produtos da PCR utilizando-se as colunas de Purificação Qiaquick – PCR Purification kit (Qiagen):

- 1 -Nos tubos contendo as colunas, pipetar 18 µL de produto de PCR e 90 µL do tampão de ligação (PB Buffer)
- 2 -Centrifugar a 18.000 g por 1 minuto a 20°C
- 3 -Descartar o líquido existente no fundo do tubo coletor após a centrifugação
- 4 -Adicionar 750 µL de tampão de lavagem (Buffer PE), preparado de acordo com a recomendação do fabricante com a adição de etanol
- 5 -Centrifugar a 18.000 g por 1 minuto a 20°C
- 6 -Descartar o líquido existente no fundo do tubo coletor após a centrifugação
- 7 -Centrifugar novamente a 18.000 g por 1 minuto a 20°C
- 8 -Desprezar o tubo coletor, trocando-o por um outro tubo novo e estéril
- 9 -Acrescentar à coluna 50 µL de tampão de eluição (Buffer EB)
- 10 -Esperar 1 minuto
- 11 -Centrifugar a 18.000 g por 1 minuto a 20°C
- 12 -Desprezar a coluna e transferir o volume de líquido com DNA purificado presente no tubo coletor para um tubo de microcentrífuga de 600 µL para estocagem em freezer a -20°C.

Protocolo para purificação de produtos da PCR utilizando-se o sistema enzimático ExoSAP-IT[®]:

- 1 -Ao retirar o tubo contendo a ExoSAP-IT[®] do freezer a -20°C, mantê-lo em gelo durante o procedimento.
- 2 -Em tubo de microcentrífuga de 600 µL, pipetar 8 µL de ExoSAP-IT[®] para cada 20 µL de produto de PCR a ser purificado.

- 3 - Incubar por 15 minutos a 37°C (nesse passo ocorre degradação dos *primers* e nucleotídeos remanescentes).
- 4 - Incubar por 15 minutos a 80°C (essa incubação tem o objetivo de inativar a ExoSAP-IT®).
- 5 - Estocar o produto purificado em freezer a -20°C para posterior utilização no seqüenciamento.

Após a purificação do produto da PCR, independentemente do protocolo utilizado, o conteúdo de DNA foi quantificado por meio de leitura em espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000).

3.2.2.8 Reação de seqüenciamento

Desta etapa em diante, os experimentos foram realizados pela doutoranda Lucimara Teixeira das Neves, com o auxílio do técnico de laboratório da FOB/USP Thiago José Dionísio, no Centro de Treinamento da empresa Applied Biosystems, localizado na cidade de São Paulo, sob supervisão dos técnicos e estagiários da empresa.

A reação de seqüenciamento nada mais é do que uma reação baseada nos mesmos princípios da PCR. A primeira diferença é que as reações das fitas forward e reverse são realizadas em ciclagens separadas. A segunda é que juntamente aos dNTPs comuns, presentes na reação, estão os dideoxynucleotídeos (ddNTPs). Estes últimos são chamados de “nucleotídeos de terminação”, pois têm a mesma característica dos deoxynucleotídeos comuns, mas nos quais foi removido o grupo hidroxila 3' terminal. O momento da ligação de uma fita molde de DNA aos ddNTPs marcados com sinal de fluorescência (“dye terminators”) determina o término da extensão da mesma, pois sem o grupo hidroxila 3' terminal não é possível ocorrer a ligação peptídica determinando a paralisação da fase de extensão. É justamente esse sinal de fluorescência do ddNTP terminal que é lido pelo seqüenciador.

Como a adição de ddNTPs marcados ocorre aleatoriamente durante a reação de seqüenciamento, no produto final encontram-se diversos fragmentos de DNA de tamanhos distintos, representando todas as extensões possíveis entre as duas

extremidades a serem analisadas. Essa marcação empregada no processo utiliza moléculas fluorogênicas, ou seja, capazes de emitir fluorescência quando excitadas por uma fonte de luz.

Uma outra característica importante da reação de seqüenciamento é que ao contrário da reação de PCR, que é exponencial, no seqüenciamento a reação é linear. Isto ocorre porque a ciclagem ocorre separadamente para as fitas forward e reverse. Logo, no tubo de reação, após a fase de desnaturação só há um *primer* iniciador para o anelamento e extensão pela AmpliTaq DNA polimerase, enquanto a outra fita do molde de DNA, que se abriu na desnaturação, se torna resíduo da reação.

Nas reações de seqüenciamento, foram utilizados de 5 a 10 ng do produto da PCR purificado. A concentração final dos *primers* foi de 0,16 μ M.

A fim de determinar um protocolo otimizado para utilização do BigDye[®] Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer (número de catálogo 4336919, Applied Biosystems, Estados Unidos) em uma amostra que apresentou resultados satisfatórios com boa intensidade de sinal de banda na reação de PCR, foram testadas a diluição de BigDye[®] v3.1 preconizada pelo fabricante e outras diluições, conforme descrito a seguir.

As condições da reação de seqüenciamento utilizando o volume de BigDye[®] v3.1 preconizado no protocolo fornecido pelo fabricante estão descritas na Figura 3 a seguir:

PRODUTO	Volume utilizado
Produto de PCR purificado	5 μ L (5-10ng)
BigDye [®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems)	8 μ L
<i>Primer</i> (Forward ou Reverse) 3,2 μ M	1 μ L
Água Destilada	6 μ L
Volume Final	20 μ L

Figura 3 - Esquema contendo os reagentes e as quantidades utilizadas na reação de seqüenciamento do éxon 3 do gene *IRF6*, testando 8 μ L de BigDye[®] v3.1

Ao seguir a recomendação do fabricante, utilizando 8 μL de BigDye[®] v3.1, não é necessário utilizar o tampão de seqüenciamento (Sequencing Buffer; número de catálogo 4339843, Applied Biosystems, Estados Unidos), pois o mix é composto por dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, tampão Tris-HCl e MgCl_2 . Tal tampão só deve ser usado quando o volume de BigDye[®] v3.1 for inferior a 8 μL , conforme descrição a seguir.

- As condições da reação de seqüenciamento com a utilização de 2 μL de BigDye[®] v3.1 estão descritas na Figura 4.

PRODUTO	Volume utilizado
Produto de PCR purificado	5 μL (5-10ng)
BigDye [®] Terminator v 3.1 (Applied Biosystems)	2 μL
Tampão do Kit BigDye [®] v3.1	3 μL
<i>Primer</i> (Forward ou Reverse) 3,2 μM	1 μL
Água Destilada	9 μL
Volume Final	20 μL

Figura 4 - Esquema contendo os reagentes e as quantidades utilizadas na reação de seqüenciamento testando 2 μL de BigDye[®] v3.1

- As condições da reação de seqüenciamento utilizando 1 μL de BigDye[®] v3.1 estão descritas na Figura 5 a seguir:

PRODUTO	Volume utilizado
Produto de PCR purificado	5 μL (5-10ng)
BigDye [®] Terminator v 3.1 (Applied Biosystems)	1 μL
Tampão do Kit BigDye [®]	3,5 μL
<i>Primer</i> (Forward ou Reverse) 3,2 μM	1 μL
Água Destilada	9,5 μL
Volume Final	20 μL

Figura 5 - Esquema contendo os reagentes e as quantidades utilizadas na reação de seqüenciamento testando 1 μL de BigDye[®] v3.1

Com base nos resultados de seqüenciamentos realizados com os diferentes volumes de BigDye[®] v3.1, determinou-se realizar a reação em todas as amostras com 2 µL de BigDye[®] v3.1. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (número de catálogo N801-0560, Applied Biosystems, Estados Unidos) devidamente seladas com selo óptico ou tampas ópticas (número de catálogo 4311971 e 4323032, respectivamente, Applied Biosystems, Estados Unidos).

O processo de ciclagem térmica, realizado nos termocicladores GeneAmp PCR System 9700 e Veriti 96 well Thermal Cycler (ambos da Applied Biosystems), consistiu de desnaturação inicial por 1 min a 96°C seguida de 25 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de desnaturação por 15 s a 96°C, anelamento por 15 s a 50°C e extensão por 4 min a 60°C. As amostras foram mantidas em 4°C até o momento da retirada dos aparelhos. Ao programar os ciclos de temperatura foi tomado o cuidado de configurar a rampa de temperatura do termociclador para subir e descer a uma velocidade de 1°C por segundo.

3.2.2.9 Purificação do produto da reação de seqüenciamento

Foram testados dois protocolos para purificar o produto da reação de seqüenciamento: 1) etanol/ácido etilenediaminotetracético (EDTA)/acetato de sódio e 2) Kit BigDye[®] v3.1 XTerminator[™] (número de catálogo 4376484, Applied Biosystems, Estados Unidos).

PROTÓCOLO etanol/ EDTA/ acetato de sódio para purificação do produto da reação de seqüenciamento (volume final de 20 µL)

Após retirar a placa de 96 poços do termociclador, realizar os seguintes procedimentos:

- 1) Centrifugação rápida a 1.000 g durante 10 s
- 2) Adicionar 2 µL de EDTA (concentração final de 12,5 mM) em cada poço da placa

- 3) Adicionar 2 μ L de Acetato de Sódio (concentração final de 0,3 M) em cada poço da placa
- 4) Adicionar 50 μ L de etanol absoluto em cada poço da placa
- 5) Tampar a placa com as tampas ópticas, cobrir a placa com papel alumínio e misturar invertendo 4 vezes
- 6) Incubar a placa coberta com papel alumínio em temperatura ambiente por 15 minutos
- 7) Centrifugar a 3.000 g por 30 minutos
- 8) Inverter a placa para dispensar o líquido, tomando cuidado para não deslocar o precipitado, realizando uma centrifugação rápida de 185 g durante 3 s com a placa invertida e então retirar da centrífuga
- 9) Adicionar 70 μ L de etanol 70% em cada poço da placa
- 10) Centrifugar a 1.650 g por 15 minutos a 4°C
- 11) Inverter a placa para dispensar o líquido e realizar novamente uma centrifugação a 185 g por 3 s com a placa invertida. Para secar bem o etanol, deixar a placa vertida sobre o papel absorvente por 5 minutos, tomando-se cuidado para não deslocar o precipitado localizado no fundo dos poços. Em seguida, recolocar a placa em suporte adequado (número de catálogo N8010531, Applied Biosystems, Estados Unidos) e cobrir com papel alumínio, de preferência em sala escura, deixando secar bem em temperatura ambiente por 30 minutos. Após o término da secagem, esse precipitado pode ser congelado a -20°C, envolto em papel alumínio, para ser ressuspense apenas no dia da corrida (é importante esclarecer que nesta tese o passo 12 foi realizado imediatamente após o término do passo 11, ou seja, nenhuma amostra foi congelada)
- 12) Ressuspender o precipitado em 10 μ L do tampão de injeção (Formamida Hi-Di, número de catálogo 4311320, Applied Biosystems, Estados Unidos)
- 13) Após selamento da placa ou colocação da septa (número de catálogo 4315933, Applied Biosystems, Estados Unidos) para a corrida, realizar a desnaturação das amostras em termociclador ajustado para a temperatura de 95°C por 3 minutos
- 14) Imediatamente após retirar a placa do termociclador, colocá-la no gelo, protegendo-a da luz por 2 minutos e, preferencialmente, em seguida colocá-la no seqüenciador

PROTOCOLO Kit BigDye® v3.1 XTerminator™ (número de catálogo 4376484, Applied Biosystems, Estados Unidos) para purificação do produto da reação de seqüenciamento (volume final de 20 µL).

Após retirar a placa de 96 poços do termociclador, realizar os seguintes procedimentos :

- 1) Centrifugação rápida a 1.000 g durante 10 s
- 2) Pipetar em cada poço da placa 20 µL de XTerminator Solution (verter o recipiente que contém o XTerminator para misturar o conteúdo a cada 3 pipetagens, pois o produto é muito viscoso e de difícil pipetagem)
- 3) Pipetar em cada poço da placa 90 µL de Sam Solution
- 4) Cobrir a placa com a septa de proteção (número de catálogo N8010550, Applied Biosystems, Estados Unidos)
- 5) Colocar a placa no vórtex de placa (modelo MS3 digital, IKA, Alemanha) por 30 minutos com velocidade de 1.500 rotações por minuto
- 6) Em seguida, realizar centrifugação rápida a 2.000 g por 2 min em temperatura de 4°C
- 7) Colocar a septa para corrida de seqüenciamento (número de catálogo 4315933, Applied Biosystems, Estados Unidos) e colocar a placa no analisador genético ABI 3130 XL para leitura.

Após a purificação, em ambos os protocolos testados, as amostras devem ser processadas no seqüenciador em até 48 horas a fim de prevenir a degradação do fluorescência, o que pode comprometer o sinal do seqüenciamento.

3.2.2.10 Leitura no Seqüenciador

O produto purificado foi submetido à leitura no seqüenciador modelo ABI 3130XL – *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), que utiliza um sistema de eletroforese capilar para a separação dos fragmentos de DNA. Nesse seqüenciador de 16 capilares, cada um deles é revestido por um eletrodo em uma das extremidades e durante a eletroforese capilar, as moléculas, fragmentos a serem

seqüenciados, tendem a ser eletroinjetadas no capilar entrando em contato com o polímero, ou seja, elas migram para o interior do capilar. Quando submetidos à alta voltagem, esses fragmentos no pólo negativo tendem a se mover no interior do capilar preenchido com o polímero (malha da corrida) em direção ao pólo positivo. A ordenação nessa migração das moléculas para a leitura vai depender do peso molecular de cada uma delas. Assim, todas essas moléculas (fragmentos) marcadas em diferentes locais com ddNTPs fluorescentes migrarão progressivamente, de acordo com o tamanho, tendo sua fluorescência detectada por um laser de detecção.

Acoplado ao seqüenciador, existe um programa de computador (Data Collection, Applied Biosystems, Estados Unidos), que gera os resultados referentes à corrida, ou seja, o eletroferograma.

3.2.2.11 Análise das seqüências obtidas

As seqüências obtidas foram analisadas com o programa de computador Sequence Scanner 1.0 software (Applied Biosystems, Estados Unidos, <http://www.appliedbiosystems.com/sequencescanner>), sendo alinhadas com o uso do programa de computador Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e por meio de consulta à base de dados Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Os eletroferogramas foram inspecionados visualmente e de maneira independente pela doutoranda Lucimara Teixeira das Neves e pelo técnico de laboratório Thiago José Dionísio a fim de detectar variações. Houve concordância de 100% nesta análise entre ambos os analisadores. As alterações encontradas no seqüenciamento utilizando o *primer* forward foram confirmadas por meio do seqüenciamento utilizando o *primer* reverse.

Cada variação de seqüência de nucleotídeos identificada no seqüenciamento foi descrita utilizando-se o sistema de nomenclatura de den Dunnen & Antonarakis

(2000). Para localizar as variações encontradas, as bases foram numeradas a partir da primeira metionina (ATG) da proteína resultante deste gene.

Para verificar se as alterações encontradas representavam polimorfismo foi realizada busca nos sites <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>, <http://www.uniprot.org> e <http://genome.ucsc.edu>. Para avaliar o efeito potencial de uma mutação no genoma, na transcrição e/ou na tradução, foram utilizados programas específicos (<http://www.genome.ucsc.edu> e http://ensembl.org/Homo_sapiens).

3.3 Análise Estatística

Para comparar as concentrações de DNA extraído a partir de sangue, saliva e swab, foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) a um critério, seguida de pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Para os dados do seqüenciamento foi realizada análise descritiva.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o seqüenciamento direto de DNA genômico tem sido o método de eleição para investigar polimorfismos e mutações nas populações e relacioná-los às doenças e também contribuiu de maneira relevante para o conhecimento do genoma humano (KARGER; GUTMAN, 2009; MILOS et al., 2009; BENNET et al., 2009). Nos diversos centros de pesquisa estão sendo utilizados protocolos distintos para a preparação das amostras com vistas ao seqüenciamento direto, cada um aplicado a um tipo de plataforma de seqüenciamento (RILEY et al., 2007; JIA et al., 2009; TANG et al., 2009; SUAZO et al., 2008; BIRNBAUM et al., 2008; PEGELOW et al., 2008). Desta forma, é imprescindível que para iniciar uma linha de pesquisa na área de seqüenciamento direto em um laboratório de Biologia Molecular seja padronizado o protocolo para a utilização de determinada plataforma de seqüenciamento.

Por se tratar de um equipamento relativamente novo, poucos trabalhos foram publicados utilizando a plataforma ABI 3130XL para seqüenciamento direto de DNA genômico humano conforme proposto por este estudo (HUANG; PAN, 2007). Grande parte dos trabalhos publicados relata a utilização de outros seqüenciadores e, portanto, realizam outros protocolos para preparação das amostras (VIEIRA et al., 2007b; VIEIRA et al., 2008c; BENNETT et al., 2009; YANG; HEBRON; HANG, 2009; JARMAN; FENTRESS; KATZ, 2009).

A maioria dos estudos envolvendo seqüenciamento direto do DNA genômico utiliza sangue como material de partida (RILEY et al., 2007; JIA et al., 2009; TANG et al., 2009; SUAZO et al., 2008; BIRNBAUM et al., 2008; PEGELOW et al., 2008). Alguns optam pela coleta de células bucais por meio de swab somente quando não é possível coletar sangue, devido à idade do paciente (VIEIRA et al., 2007b; GHASSIBÉ et al., 2005). A saliva é o material de partida para extração de DNA menos citado na literatura (AIDAR; LINE, 2007; VIEIRA et al., 2008c; BENNET et al., 2009). Entretanto, é o material de mais fácil acesso e não necessita de intervenção invasiva para a coleta.

O objetivo principal deste estudo foi validar e padronizar um protocolo para seqüenciamento direto de DNA genômico extraído a partir de saliva total na plataforma do Analisador Genético ABI 3130XL (Applied Biosystems), a ser utilizado no Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP.

Foi escolhido o gene *IRF6* para seqüenciamento, pois ele representa um gene candidato à etiologia genética tanto do fenótipo fissura labiopalatina não-sindrômica como do fenótipo agenesia dentária (ZUCHERO et al., 2004; BLANTON et al., 2005; SCAPOLI et al., 2005; PARK et al., 2007; VIEIRA et al. 2007a; VIEIRA et al., 2007b; VIEIRA et al., 2008b; VIEIRA et al., 2008c; SILVA, 2007; JIA et al., 2009). A descoberta de variações na seqüência nos indivíduos deste estudo com esses fenótipos que pudessem ser relacionadas a esse gene representariam uma contribuição significativa na tentativa de elucidar a etiologia genética de ambos os fenótipos.

Iniciou-se a triagem de mutação pelo éxon 3 desse gene, pois alguns trabalhos investigando a relação do *IRF6* e os fenótipos de fissura não-sindrômica e da síndrome de van der Woude encontraram mutações exatamente nesse éxon tanto no grupo com fissura labiopalatina como no grupo com síndrome de van der Woude (BIRNBAUM et al., 2008; JEHEE et al., 2009). Além disso, essa região representa um locus importante do gene onde ocorre ligação à proteína, ou seja, uma possível região de função crítica na proteína (JEHEE et al., 2009).

Ao investigar a relação do *IRF6* com os fenótipos fissura labiopalatina e agenesia dentária, em diferentes populações, a maioria dos estudos analisou polimorfismos em locais específicos por meio de outras metodologias, seqüenciando somente partes do gene e dos casos para confirmar a ocorrência desses polimorfismos (VIEIRA et al., 2007a; VIEIRA et al., 2007b; VIEIRA et al., 2008b; VIEIRA et al., 2008c; VIEIRA et al., 2008d; RILEY et al., 2007; JIA et al., 2009; TANG et al., 2009). Neste estudo, foi seqüenciado o éxon 3 inteiro incluindo as regiões de splice do éxon e em todas as amostras foram seqüenciadas as fitas forward e reverse para confirmação.

4.1 Análise Molecular - Estudo piloto

4.1.1. – Análise de fluidos para extração de DNA genômico

No estudo piloto observou-se presença de bandas de produto de PCR para β -actina (gene constitutivo) a partir do DNA extraído dos três fluidos analisados (sangue, saliva e swab) (Figura 6).

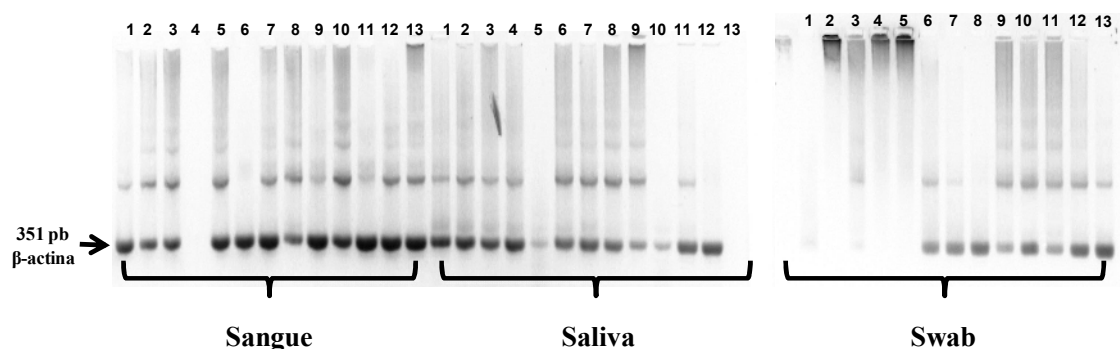


Figura 6 - Gel de agarose corado com brometo de etídeo exposto a luz ultravioleta mostrando produtos de PCR de β - actina (351pb) utilizando DNA genômico total concentrado obtido de sangue, saliva e swab. Cada número acima dos poços no gel representa um voluntário. Assim observa-se o DNA obtido de cada fluido para cada voluntário

Essa análise da presença e intensidade da banda foi confirmada pela quantificação dessas amostras em espectrofotômetro (NanoDropTM 1000), que demonstrou quantidade suficiente de DNA nos três fluidos (Tabela 1).

Tabela 1: Quantificação por espectrofotometria do DNA extraído a partir de três fluidos (sangue, saliva e swab)

Amostra	Sangue (ng/ μ L)	Saliva (ng/ μ L)	Swab (ng/ μ L)
4	265	280	70
6	420	415	105
8	370	120	105
10	355	260	150
13	140	375	150
15	120	150	90
16	260	455	90
Média	275,71	293,57	108,57
Erro padrão da Média	43,38	48,67	11,58

A concentração de DNA extraído a partir de amostras de swab mostrou-se significativamente mais baixa em comparação à concentração de DNA extraído a partir de amostras de sangue e saliva, que se mostraram semelhantes (Tabela 1). A maioria dos trabalhos na área de biologia molecular utiliza o sangue como fonte de DNA genômico para as análises de polimorfismos e mutações (RILEY et al., 2007; JIA et al., 2009; TANG et al., 2009; SUAZO et al., 2008; BIRNBAUM et al., 2008; PEGELOW et al., 2008). Para a coleta desse fluido é necessário um exame invasivo, que por vezes, principalmente em se tratando de crianças e adolescentes, poderia inviabilizar os estudos, pois os indivíduos ou seus responsáveis poderiam não aceitar a participação (AIDAR; LINE, 2007). Os resultados obtidos indicam claramente que é possível utilizar a saliva para extração de DNA com fins de uso em reação de PCR.

É fato induscutível que o sangue é um fluido mais puro para extração do DNA, uma vez que ele é extraído dos linfócitos presentes no plasma sangüíneo, que raramente podem estar misturados a outros microorganismos. A saliva, por outro lado, apresenta algumas características como alto conteúdo protéico e a grande diversidade de microorganismos que fazem parte da flora bucal e inibidores naturais da PCR, que poderiam interferir negativamente na amplificação do DNA (MESSANA et al., 2008). Essas características mencionadas podem ser minimizadas durante o protocolo de extração, com a utilização de resinas que têm a capacidade de quelar inibidores naturais da PCR (SAKAI et al., 2007). Não se pode deixar de levar em consideração que na quantificação do DNA obtido da saliva o valor observado representa o somatório do DNA genômico do voluntário participante do estudo e dos microorganismos presentes na cavidade bucal (GROSJEAN et al., 2009). Porém, esse DNA bacteriano não interfere na reação de PCR de maneira a impedi-la, pois são utilizados *primers* específicos para a amplificação de DNA humano. Adicionalmente, como observado na PCR realizada com DNA obtido da saliva e swab, fica demonstrado que é possível realizar amplificação de DNA por meio da PCR com as células dos fluidos bucais como material de partida. Esses achados estão de acordo com Aidar e Line (2007) e Bennet e colaboradores (2009), os quais confirmaram a possibilidade de utilizar a saliva como fonte de DNA para estudos genômicos.

4.1.2 Padronização da temperatura de anelamento para PCR do éxon 3 do gene *IRF6* a partir de DNA extraído de saliva total dos voluntários participantes do estudo piloto

A única temperatura de anelamento dos *primers* testada neste estudo, 63°C, mostrou-se adequada para amplificação do éxon 3 do gene *IRF6*, como pode ser observado na Figura 7, pois proporcionou aparecimento de banda de tamanho esperado (302 pb) no gel de agarose corado com brometo de etídeo em todas as diluições de DNA testadas (1:1, 1:2 e 1:3). As medidas em espectrofotômetro das concentrações de DNA nas diferentes diluições supracitadas permitiram estabelecer que a utilização de 500 ng de DNA como material de partida resultariam em amplificação satisfatória do éxon 3 do gene *IRF6* por meio da PCR. Esses valores estão um pouco acima dos 100 ng utilizados por Bennet e colaboradores (2009) para amplificação de outro gene.

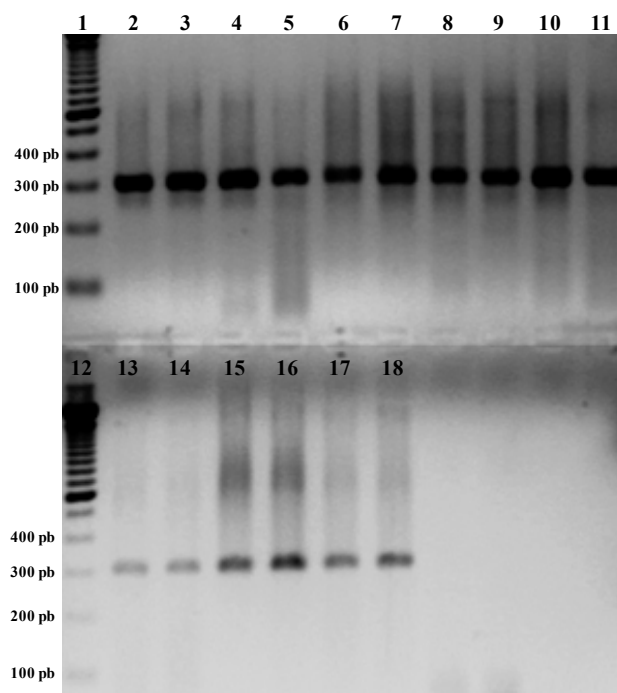


Figura 7 - Gel de agarose corado com brometo de etídeo representando as amplificações do éxon 3 (302 pb) do gene *IRF6* para 4 voluntários. Neste experimento foram testadas quatro concentrações de DNA. 1 e 12 - marcador de peso molecular; de 2 a 5 – voluntário 1 com 4 concentrações de DNA distintas (DNA concentrado, DNA diluído 1:1, DNA diluído 1:2 e DNA diluído 1:3 respectivamente); de 6 a 9 voluntário 2 com 4 concentrações de DNA distintas (DNA concentrado, DNA diluído 1:1, DNA diluído 1:2 e DNA diluído 1:3 respectivamente); de 10 a 11 e de 13 a 14 voluntário 5 com 4 concentrações de DNA distintas (DNA concentrado, DNA diluído 1:1, DNA diluído 1:2 e DNA diluído 1:3 respectivamente); de 15 a 18 voluntário 9 com 4 concentrações de DNA distintas (DNA concentrado, DNA diluído 1:1, DNA diluído 1:2 e DNA diluído 1:3 respectivamente)

4.2 Análise Molecular - Preparação das amostras do grupo de estudo

4.2.1 Extração do DNA a partir de saliva total dos voluntários dos grupos estudados

Na tabela 2 são apresentadas as concentrações de DNA medidas em espectrofotômetro para os três protocolos analisados para extração de DNA a partir de saliva, conforme descrito na metodologia, em três amostras distintas submetidas aos três protocolos testados nesta tese.

Tabela 2: Quantificação de DNA obtido em cada protocolo de extração de DNA de saliva

Número da amostra	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
2024	45 ng/ μ L	111,3 ng/ μ L	148,1 ng/ μ L
508	8 ng/ μ L	31,5 ng/ μ L	50,7 ng/ μ L
521	139 ng/ μ L	57 ng/ μ L	182,4 ng/ μ L

O procedimento de extração de DNA é um dos mais importantes no seqüenciamento, uma vez que será obtido o material de partida para todas as etapas posteriores, sendo crucial para determinar a qualidade e quantidade do DNA (AIDAR; LINE, 2007).

O princípio dos protocolos testados baseia-se na lavagem e lise celular, mantendo no sobrenadante o DNA liberado do núcleo das células. Na presença do InstaGeneTM Matrix, uma resina quelante, inibidores naturais da PCR são capturados, o que confere maior qualidade ao DNA extraído. Ao comparar os três protocolos de extração de DNA de saliva observa-se que o protocolo 3 apresentou os melhores resultados quando avaliada a concentração de DNA após a extração. Esse protocolo 3 exige uma quantidade maior de reagentes, exigindo um pouco mais de tempo para sua execução. Nesse protocolo, são utilizados além do InstaGene Matrix, a proteinase K e SDS. Esses últimos são utilizados com o intuito de degradar proteínas presentes na saliva, que poderiam interferir na reação de PCR ou mascarar a leitura em espectrofotômetro.

A proteinase K é uma serinoprotease não-específica que tem atividade proteolítica, ou seja, atua na quebra, inativação e digestão de proteínas da saliva em condições de temperatura ideais (por volta de 65°C). Por isso, é importante que durante a extração após adição de proteinase K a solução seja mantida nessa temperatura por pelo menos 30 minutos, como estabelecido no protocolo 3. Ao ser adicionada, a proteinase K rapidamente inativa nucleases endógenas como as RNases e DNases (GOLDENBERGER et al., 1995).

O SDS, surfactante aniônico com propriedade detergente, utilizado em conjunto com a proteinase K, é um tipo de desnaturante protéico e tem o objetivo de ativar e potencializar a ação da proteinase K, estimulando sua atividade na quebra de proteínas (GOLDENBERGER et al., 1995). A ação desses dois reagentes em conjunto com as propriedades quelantes do InstaGene Matrix apresentou os melhores resultados na quantificação de DNA extraído a partir de saliva.

Os resultados referentes à quantidade e qualidade do DNA extraído de saliva de todas as amostras estão dispostos no Apêndice A.

4.2.2 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) do éxon 3 do gene *IRF6* no grupo de estudo

Para que a amplificação de DNA por meio da PCR ocorra de maneira adequada, além da padronização prévia das condições gerais da reação, ou seja, quantidade de concentração dos reagentes e padronização das temperaturas para ciclagem, é muito importante dar atenção a dois pontos: 1) a concentração do DNA de partida, já discutido anteriormente, e 2) características dos *primers* a serem utilizados.

Deve-se ter em mente que esses *primers* serão os mesmos utilizados em duas etapas distintas do processamento das amostras para o seqüenciamento direto. Na primeira PCR, utiliza-se o par forward e reverse para a reação de PCR, na qual o objetivo é a amplificação exponencial do fragmento a ser analisado. Na segunda PCR, chamada nesta tese de reação de seqüenciamento, utiliza-se cada um dos *primers* (forward ou reverse) separadamente com o objetivo de realizar uma

amplificação linear. Logo, deve-se atentar para algumas características importantes dos *primers*.

A primeira delas diz respeito a alguns cuidados que devem ser observados para o desenho dos *primers*. O número ideal de pares de bases (pb), não deve exceder 24, porque *primers* muito extensos dificultam a etapa de anelamento dos mesmos durante a reação. Ao analisar as bases dos *primers*, deve-se verificar os conteúdos de bases A-T e C-G. O conteúdo de bases C-G, quando em excesso, pode elevar a temperatura de anelamento, podendo impedir ou interferir negativamente na reação de PCR (BENNET et al., 2009). Vale lembrar que as bases nitrogenadas A-T mantêm ligações por meio de duas pontes de hidrogênio e as bases C-G estão ligadas por três pontes de hidrogênio. Logo, a temperatura necessária para quebrar as ligações C-G são mais elevadas do que as temperaturas para separar A-T, o que influi diretamente na temperatura de anelamento dos *primers*.

Após o desenho dos *primers*, é necessário consultar, por meio de sites especializados, a homologia deles dentro do próprio genoma, ou seja, a especificidade deles. Este passo é importante porque os *primers* podem ser semelhantes a duas ou mais regiões do genoma, e, ao contrário do esperado, poderão ser amplificadas outras regiões que não as de interesse para o estudo. É importante realizar esta checagem também para verificar homologia com outras espécies, o que é interessante no caso da saliva visto que nesse fluido encontram-se diversas espécies de microrganismos, que provavelmente também terão seu DNA disponível para amplificação.

Analisando o desenho dos primers para o processo de seqüenciamento, deve-se lembrar que é comum a falha na leitura de algumas bases no início e no final da seqüência do produto de seqüenciamento. Assim, os *primers* devem ser desenhados para se hibridizarem às regiões intrônicas, de forma que mesmo com a perda das extremidades no seqüenciamento seja possível analisar o éxon e as regiões de splice por completo. Desta forma, cada *primer* deve ser desenhado de modo a flanquear o fragmento de DNA de interesse na região entre 30 a 100 pb intrônicas adjacentes ao éxon, conforme descrito por Bennet et al. (2001). Porém,

como menciona Bennet e colaboradores (2009) em um outro estudo, o fragmento final, idealmente, não deve ultrapassar 600 pb.

4.2.3 Eletroforese em gel de agarose para verificar amplificação do éxon 3 do gene *IRF6*

A constatação de amplificação do éxon 3 do gene *IRF6* (produto de PCR contendo 302 pb) está demonstrada na Figura 8.

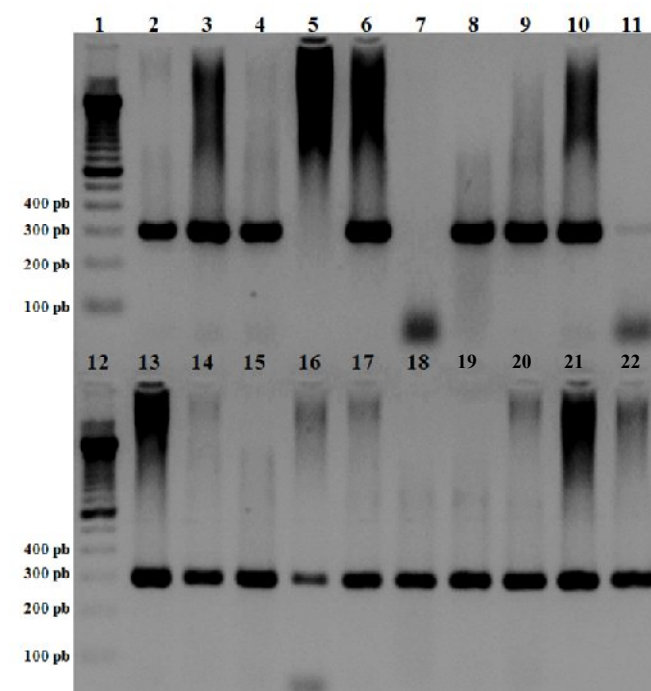


Figura 8 - Gel de agarose corado com brometo de etídeo representando as amplificações do éxon 3 (302 pb) do gene *IRF6* de voluntários dos grupos 2 e 4. Este fase do experimento foi realizada para todos os voluntários a fim de detectar a amplificação do produto da PCR para futuras análises de seqüenciamento. 1 e 12 - marcador de peso molecular; cada um dos demais números representa a amostra de um voluntários dos grupos de estudo 2 e 4

A análise da Figura 8 demonstra que algumas amostras não apresentaram sinal positivo para amplificação na PCR. Nesses casos, a reação de PCR foi repetida até que houvesse sinal de banda de tamanho esperado (302 pb) no gel de agarose, corado com brometo de etídeo, confirmando a amplificação por PCR. Esses resultados corroboram achados da literatura, que relatam sucesso em torno de 80% na amplificação por PCR (JARMAN; FENTRESS; KATZ, 2009). Ao contrário do encontrado neste estudo, outro grupo de pesquisadores relatou aproveitamento próximo de 100%, uma vez que utilizaram modificadores da reação padrão

(BENNET et al., 2009). Esta variação no resultado de amplificação por PCR poderia ser explicada em função de diferenças no conteúdo protéico residual de cada amostra, o que poderia ter interferido negativamente na reação de PCR, conforme já documentado na literatura (JARMAN; FENTRESS; KATZ, 2009).

4.2.4 Purificação do produto de PCR

Na Tabela 3 e na Figura 9 estão expressos os resultados obtidos com os dois protocolos testados para purificação do produto de PCR do éxon 3 (*IRF6*). Na Tabela 3, encontram-se os valores para a qualidade e a quantidade do produto de PCR antes da purificação e após a utilização do protocolo com ExoSap e com colunas especiais. E na Figura 9 está sendo mostrado o gel de agarose corado com brometo de etídeo, que revela as bandas do produto de PCR antes da purificação e após os dois protocolos de purificação testados para as quatro amostras.

Tabela 3: Quantificação e qualidade do produto de PCR antes e após a utilização de dois protocolos de purificação

Número da amostra	Produto de PCR antes da purificação (éxon 3 – <i>IRF6</i>) concentração em ng/ μ L e qualidade (A260 nm/A280 nm)	Produto de PCR purificado pelo método ExoSap concentração (ng/ μ L) e qualidade (A260/A280)	Produto de PCR purificado pelo método de coluna concentração (ng/ μ L) e qualidade (A260/A280)
512	459,4 (1,85)	331,3 (1,76)	14,8 (1,91)
514	462,3 (1,84)	335 (1,76)	13,2 (2,12)
1016	458,6 (1,84)	330,2 (1,76)	12,3 (2,15)
2005	459,6 (1,84)	336,1 (1,77)	8,3 (1,94)

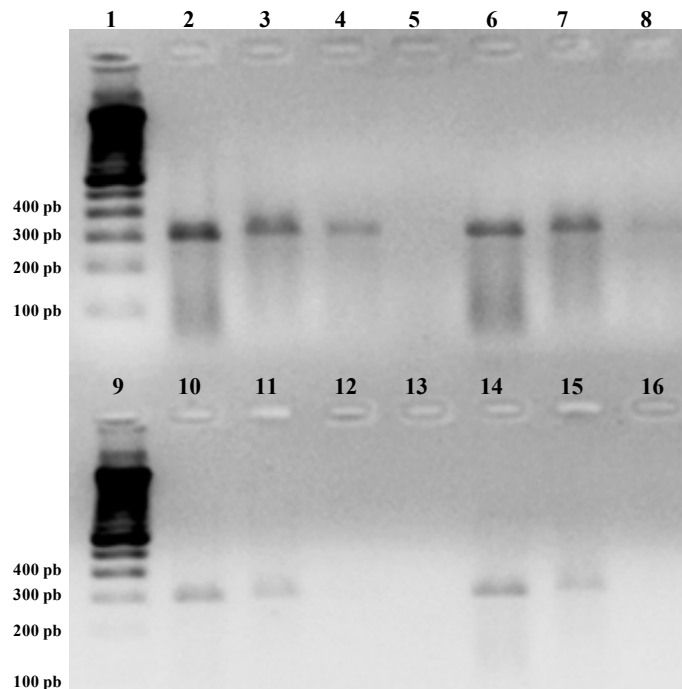


Figura 9 - Gel de agarose corado com brometo de etídeo representando as amplificações do éxon 3 (302 pb) do gene *IRF6* para 4 voluntários. Neste experimento foram testados dois métodos de purificação do produto da PCR, ExoSAP e Colunas. 1 e 9 - marcador de peso molecular; de 2 a 4 – voluntário 512 (PCR não purificado , PCR purificado com ExoSap e PCR purificado com colunas respectivamente); 5 e 13 – vazios; de 6 a 8 – voluntário 514 (PCR não purificado , PCR purificado com ExoSap e PCR purificado com colunas respectivamente); de 10 a 12 – voluntário 1016 (PCR não purificado , PCR purificado com ExoSap e PCR purificado com colunas respectivamente); de 14 a 16 – voluntário 2005 (PCR não purificado , PCR purificado com ExoSap e PCR purificado com colunas respectivamente)

Após a amplificação por PCR, dNTPs e *primers* não consumidos na reação permanecem em contato com os produtos da PCR e esses resíduos podem interferir negativamente na reação de seqüenciamento. Por esse motivo, é indicada a purificação do produto da PCR antes da reação de seqüenciamento (BELL, 2008). Assim, o objetivo dessa etapa na preparação das amostras para seqüenciamento direto é promover uma limpeza nesse produto de PCR. O ideal é que essa purificação mantenha ao máximo, em quantidade e qualidade, o produto da PCR.

Analisando os resultados obtidos tanto para a quantificação e qualidade (Tabela 3) e avaliando o gel de eletroforese (Figura 9) para cada um dos protocolos, destaca-se a maior concentração dos produtos de PCR no protocolo utilizando o método ExoSAP. Este resultado está de acordo com outros estudos que também analisaram ambos os protocolos (DUGAN et al., 2002; JARMAN; FENTRESS; KATZ, 2009).

Os dois protocolos utilizados partem de princípios diferentes para a purificação dos produtos de PCR. O princípio de ação do protocolo com ExoSAP-IT® ocorre por meio de mecanismo de limpeza enzimática no próprio tubo de reação da PCR. Esse protocolo baseia-se na ação da enzima Exonuclease I, com potencial de ação na temperatura de 37°C degradando *primers* e dNTPs não consumidos. Em seguida, a enzima é inativada no próprio tubo de reação por meio do calor excessivo (incubação a 80°C). As vantagens principais desse protocolo são a rapidez e o número reduzidos de passos e reagentes. Por outro lado, os resíduos, gerados a partir da ação da enzima, permanecem no mesmo tubo em contato com o produto de PCR a ser diluído para o seqüenciamento, ou seja, enzima inativada e contaminantes podem ser incluídos na solução que será submetida à reação de seqüenciamento.

O protocolo que purifica os produtos de PCR com colunas especiais conceitualmente funciona por meio de uma membrana de sílica presente na coluna que tem a finalidade de reter o DNA (produto da PCR) presente em alta concentração, permitindo a passagem dos contaminantes, restos de *primers* e dNTPs. Desta forma, as impurezas são removidas eficientemente e o DNA retido na membrana encontra-se puro. No último passo desse protocolo é adicionada uma solução de eluição, que promove a retirada desse DNA retido na membrana. Apesar da perda verificada pelo gel de agarose corado com brometo de etídeo (Figura 9) e do maior número de passos desse protocolo com coluna, o produto apresenta pureza inquestionável, uma vez que todos os resíduos presentes na reação de PCR não são retidos pela coluna e são eliminados, sendo atraídos e retidos pela membrana de sílica presente na coluna, que tem carga positiva, somente os fragmentos de DNA amplificados na PCR, que têm carga negativa.

Pela análise do gel de agarose corado com brometo de etídeo é possível inferir que o produto purificado pelo protocolo da coluna mantém uma banda mais limpa, apesar de menor intensidade. Entretanto, esse fato não é tão relevante, pois para a reação de seqüenciamento esse produto precisa ser diluído a concentrações muito baixas de acordo com o número de pares de base a serem analisadas, seguindo as recomendações do fabricante do analisador de DNA utilizado nesta tese (Applied Biosystems). Assim, ficou definida a utilização das colunas de purificação para o protocolo de seqüenciamento pela qualidade de purificação, apesar do custo

mais elevado do que o protocolo com uso da ExoSap. Esta decisão está de acordo com Bennet et al. (2001), que também utilizaram método de purificação por colunas de produto de PCR para seqüenciamento.

É necessário e importante quantificar o produto purificado da PCR, uma vez que, como descrito, resíduos da reação de PCR podem interferir na reação de seqüenciamento e excesso ou escassez de produto podem comprometer a qualidade do seqüenciamento direto, especialmente na plataforma ABI 3130 XL (BENNET et al., 2001). Os resultados referentes à quantificação do produto purificado para cada amostra encontram-se no Apêndice B. Pôde-se observar que as amostras apresentaram padrões semelhantes de concentração após a purificação pelo método de coluna, mesmo partindo de quantidades diferentes de produto de PCR. Isso confirma a capacidade seletiva de ligação da membrana de sílica da coluna a uma determinada quantidade de DNA produto de PCR.

O seqüenciamento adequado na plataforma ABI 3130 XL depende de vários fatores, um dos mais relevantes é a diluição correta do produto de PCR purificado, uma vez que para a reação de seqüenciamento esse molde de DNA (produto de PCR) deve ser padronizado e necessariamente tem que estar dentro de um limite máximo e mínimo de acordo com o número de pares de bases (pb) do fragmento a ser seqüenciado. O fragmento que contém o éxon 3 do gene *IRF6*, analisado neste estudo, tem 302 pb. Para o seqüenciamento de fragmentos entre 200 e 500 pb, como é o caso do exon 3, deve ser utilizada uma quantidade final de produto de PCR entre 3 e 10 ng em 20 µL de volume final na reação de seqüenciamento (protocolo da Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com.br)

4.2.5 Reação de Seqüenciamento

Para padronização do protocolo das reações de seqüenciamento foram testados três volumes diferentes de BigDye[®] v3.1: o preconizado pelo fabricante (8 µL do estoque) e dois outros (1 ou 2 µL do estoque) complementados com solução tampão de seqüenciamento. Esse experimento teve como objetivo otimizar a utilização do BigDye[®] v3.1 Terminator, pois se trata de um reagente de custo

elevado. Os resultados do seqüenciamento nesses três volumes podem ser observados na Figura 10.

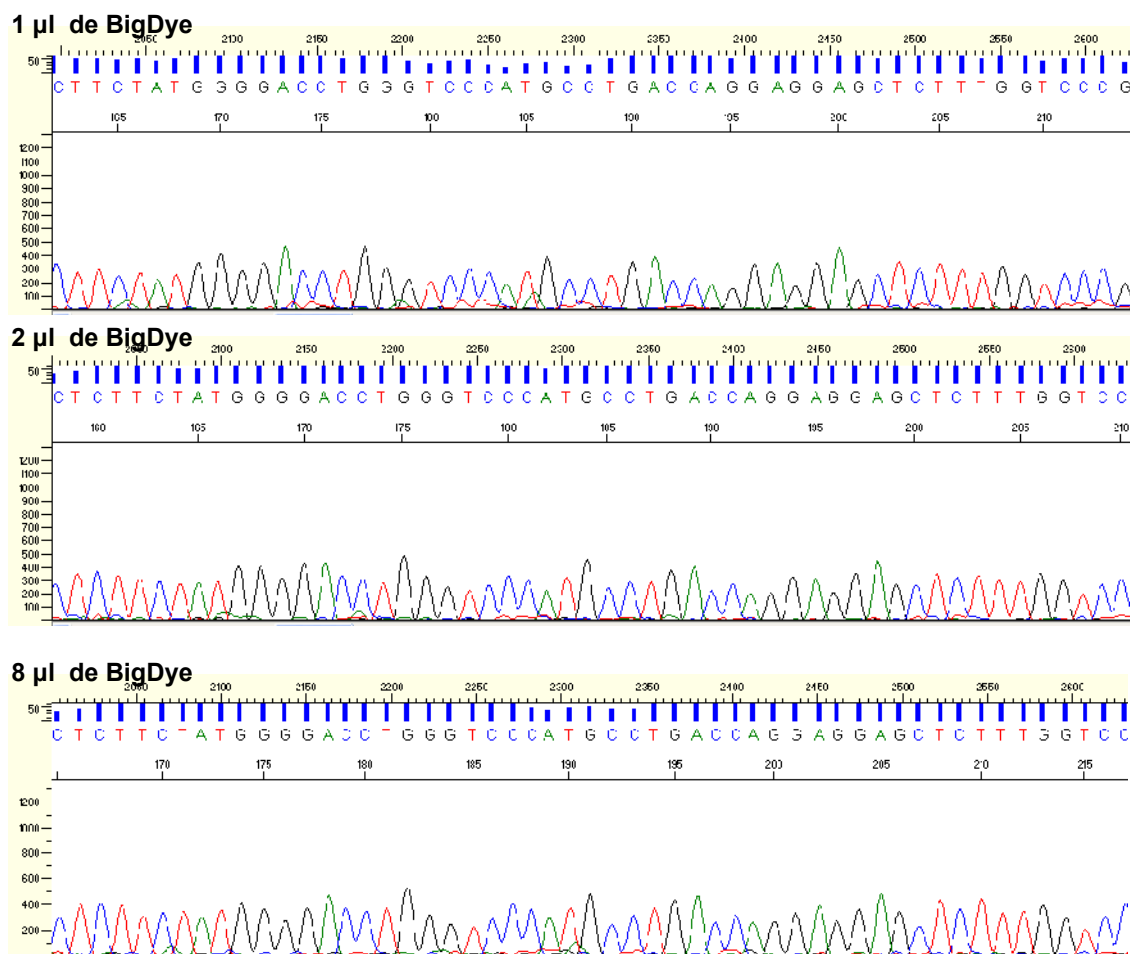


Figura 10 - Eletroferogramas das seqüências de DNA do éxon 3 (*IRF6*) do mesmo indivíduo utilizando três volumes diferentes de BigDye[®] Terminator v3.1 na reação de seqüenciamento de DNA extraído de amostra de saliva. A base A está representada em verde; a base T em vermelho; a base C em azul e a base G em preto

Ao analisar os resultados referentes aos três volumes de BigDye[®] v3.1 (1, 2 ou 8 µL), observa-se um padrão muito semelhante na intensidade do sinal para as quatro bases nos três seqüenciamentos. A diferença apresentada é em relação ao “background” ou ruído, que aparenta ser levemente superior no seqüenciamento utilizando 1 µL de BigDye[®] v3.1, mas que permite boa análise.

O eletroferograma das seqüências com a utilização de 2 e 8 µL de BigDye[®] v3.1 apresentou padrão muito semelhante. Assim, avaliando a melhor relação custo-benefício fica evidente a possibilidade de utilização de 2 µL de BigDye[®] v3.1 na

reação de seqüenciamento sem comprometer a qualidade dos resultados. Esta constatação está de acordo com outros trabalhos que também testaram diluições diferentes do padrão para otimizar e reduzir custos na utilização desse mix (BENNET et al., 2001; JARMAN; FENTRESS; KATZ et al., 2009; YANG; HEBRON; HANG, 2009; BENNET et al. 2009).

4.2.6 Purificação do produto da reação de seqüenciamento

A purificação do produto da reação de seqüenciamento tem o mesmo objetivo que qualquer outra purificação, eliminar resíduos da solução, tais como restos de ddNTPs, dNTPs e outros reagentes não consumidos na reação, de forma que eles não interfiram ou atrapalhem na leitura realizada pelo seqüenciador.

Durante a reação não há consumo total dos reagentes. Os dNTPs residuais migram para o capilar juntamente com os fragmentos a serem seqüenciados em uma relação de competição, que gera erros na leitura dos fragmentos seqüenciados pelo equipamento. Adicionalmente, íons presentes no tampão também competem com os fragmentos durante a injeção no capilar, causando diminuição do sinal.

Ao realizar essa etapa de purificação na preparação das amostras, com a remoção desses resíduos espera-se que não ocorra interferência na leitura e nem competição entre DNA e íons do tampão, resultando em boa intensidade de sinal para o seqüenciamento.

No presente estudo, foram testados dois protocolos para a purificação do produto da reação de seqüenciamento, cujos resultados encontram-se nas Figuras 11 e 12.

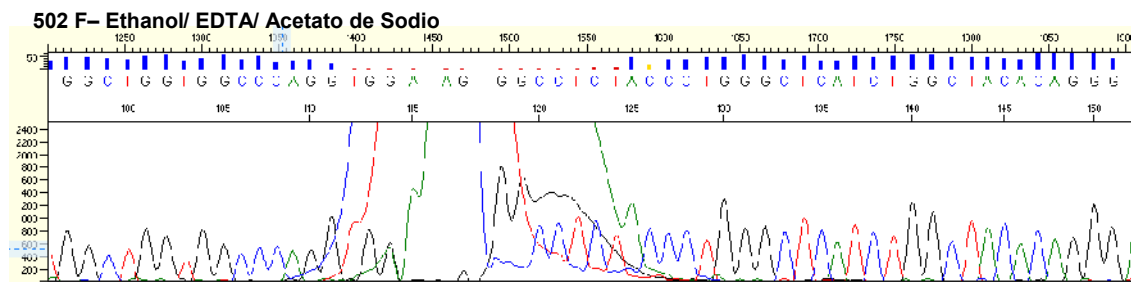


Figura 11 - Eletroferograma da seqüência de DNA obtida utilizando o protocolo etanol/ EDTA/acetato de sódio para purificação do produto da reação de seqüenciamento. A base A está representada em verde; a base T em vermelho; a base C em azul e a base G em preto

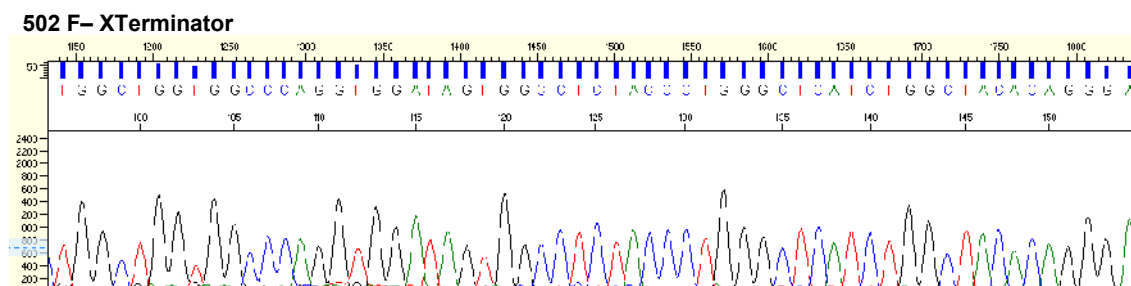


Figura 12 - Eletroferograma da seqüência de DNA obtida utilizando o protocolo XTerminator para purificação da reação de seqüenciamento. A base A está representada em verde; a base T em vermelho; a base C em azul e a base G em preto

No eletroferograma referente ao seqüenciamento em que foi utilizado protocolo de purificação com etanol/EDTA/acetato de sódio (Figura 11) pode-se observar a detecção de ruídos de fluorescência (manchas na seqüência), estes podem estar relacionados a evaporação incompleta do etanol, porém até o momento esta especulação não pôde ser comprovada.

No protocolo com XTerminator, utilizam-se duas soluções que fundamentam-se na remoção de restos de ddNTPs e dessalinização da amostra. A primeira solução, o “XTerminator solution”, atua por ligação às impurezas, mantendo na solução somente os fragmentos para seqüenciamento. A segunda solução, “Sam Solution”, remove os ddNTPs residuais e estabiliza os fragmentos remanescentes para o seqüenciamento. A centrifugação por 30 minutos no vórtex tem o objetivo de deslocar essas impurezas residuais para o fundo do poço de reação, o que aumenta a probabilidade de menor intensidade de ruídos no seqüenciamento.

Observou-se neste estudo que houve grande perda na leitura das primeiras bases da seqüência. Porém, esse padrão ocorreu para os dois protocolos testados.

No momento não existem argumentos para explicar tais resultados, o que certamente motivará estudos futuros no laboratório do orientador desta tese.

Analisando os resultados obtidos em cada um dos protocolos (Figuras 11 e 12), verifica-se que o protocolo com XTerminator™ (Applied Biosystems) foi superior, tanto em número de bases seqüenciadas quanto na confiabilidade da leitura de cada base. No protocolo utilizando etanol/EDTA/acetato de sódio observam-se muitas regiões com ruídos fluorescentes (já mencionados anteriormente), que talvez possa ser explicado pela evaporação inadequada do etanol do produto de seqüenciamento, além do menor número de bases seqüenciadas com alta confiabilidade.

Assim, apesar do custo elevado, o protocolo de eleição para purificação que demonstrou melhor padrão de seqüência foi o XTerminator™. Deve-se ter atenção especial na escolha do modo de injeção do capilar para leitura no seqüenciador automático. Utilizando-se o XTerminator™, o volume final de reação é de 130 µL, lembrando que no fundo dos poços da placa encontram-se as impurezas. Nesse caso, o capilar deverá ter um modo de injeção na região intermediária do poço, para que não entre em contato com os resíduos. Desta forma, o modo de injeção deve ser selecionado sempre de acordo com o protocolo de purificação utilizado.

4.2.7 Análise das seqüências

Para visualização e análise dos dados obtidos na leitura do seqüenciador estão disponíveis programas de computador específicos. Neste estudo foi utilizado o programa Sequence Scanner, que permite a visualização do relatório geral das amostras seqüenciadas, classificando-as de acordo com a intensidade do sinal e número de bases seqüenciadas (Figura 13). Além disso, este programa possibilita a análise do eletroferograma (Figura 14) e a visualização da seqüência e a confiabilidade da mesma (Figura 15).

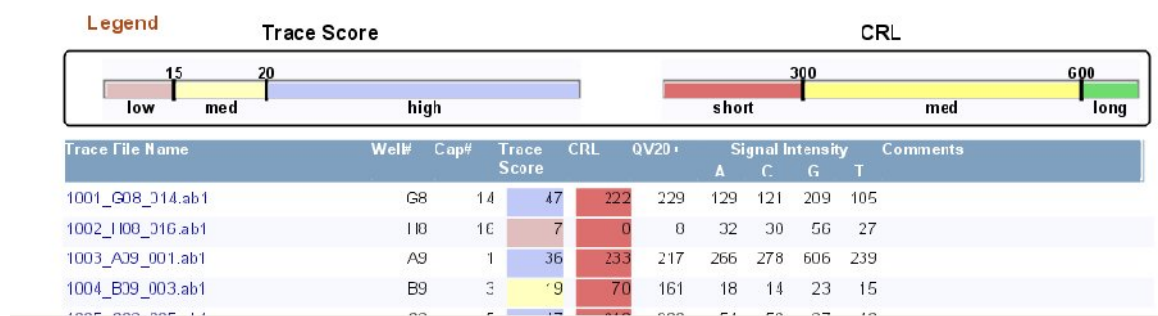


Figura 13 - Relatório geral de qualidade mostrando todas as amostras seqüenciadas e a atribuição de qualidade conferida a cada uma de acordo com os parâmetros definidos pelo programa (coluna *trace score*). A atribuição de cor vermelha a uma amostra representa baixa qualidade de seqüência, a cor amarela média qualidade e a cor azul, alta qualidade de seqüência. Na coluna com a sigla CRL estão expressos os tamanhos dos fragmentos seqüenciados em cada amostra

O objetivo desse relatório geral é classificar as amostras seqüenciadas de acordo com a qualidade das seqüências em três cores. A cor vermelha indica seqüência com baixo grau de qualidade e poucas bases seqüenciadas. A cor amarela revela seqüência com grau de qualidade médio e número intermediário de bases seqüenciadas, enquanto a cor azul significa alto grau de qualidade na seqüência e grande parte das bases seqüenciadas. Quando não é possível a determinação de nenhuma base da seqüência, o programa classifica a amostra com a sigla "N/A", que significa não analisado. As amostras classificadas como não analisadas (N/A) ou classificadas com as cores amarelo e vermelho, necessariamente devem ser repetidas.

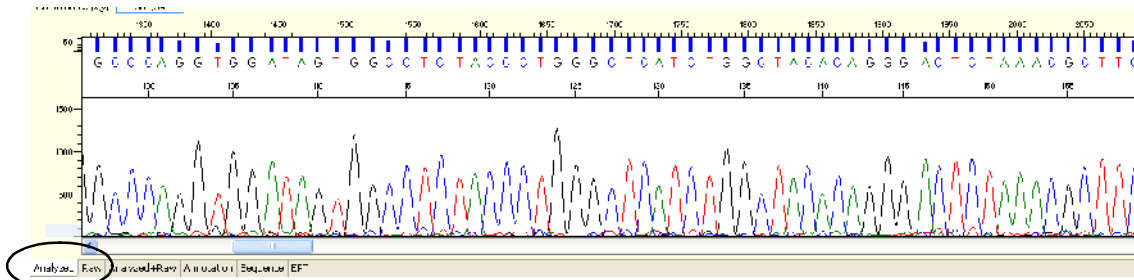


Figura 14 – Eletroferograma (apresentação gráfica de uma seqüência) obtido de uma das amostras de DNA extraído de saliva. A base A está representada em verde; a base T em vermelho; a base C em azul e a base G em preto

O parâmetro *analyse* demonstrado na figura 14 acima, talvez seja o mais importante a ser analisado, uma vez que é a partir dele que visualmente ou por meio de programas de computador são avaliadas as variações de seqüência heterozigotas.

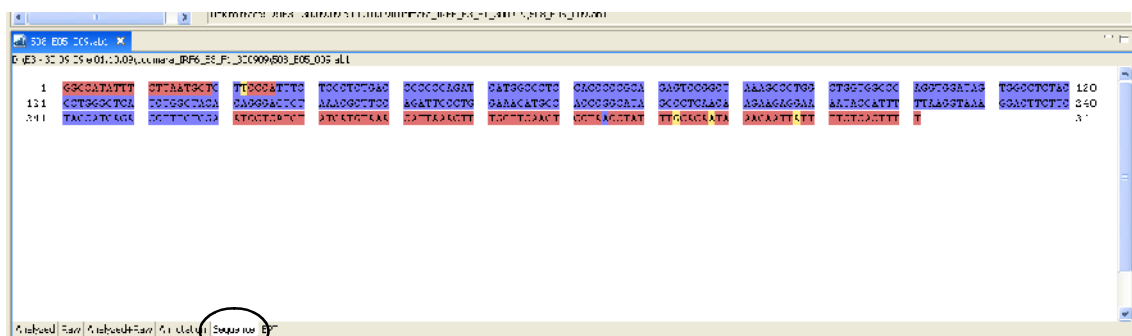


Figura 15 - Visualização de toda seqüência obtida de uma amostra seqüenciada a partir de DNA extraído de saliva. As cores atribuídas a cada base representam a confiabilidade da leitura de cada uma (azul = alta confiabilidade; amarelo = confiabilidade média e vermelho = baixa confiabilidade)

Quanto ao parâmetro seqüência (Figura 15) a verificação da mesma permite avaliar a confiabilidade da leitura de cada base e a ordenação das bases nesse fragmento. E a partir dessa seqüência é possível compará-la à do genoma humano por meio de sites já descritos no capítulo de metodologia com o objetivo de triar mutações ou polimorfismos.

Ao avaliar todos esses parâmetros concluiu-se que o mais importante na análise de cada seqüência é a observação de picos e vales bem definidos para a leitura no eletroferograma, critério esse adotado também por Bennet et al. (2009).

A partir da avaliação criteriosa de todos esses parâmetros supracitados foi possível definir quais amostras puderam ser analisadas e quais necessitaram de repetição.

4.3 Casuística e Análise das Seqüências para triagem de mutação nos grupos estudados

4.3.1 Casuística

A maioria dos estudos investigando genes candidatos ou realizando triagem de mutação em indivíduos com fissura não-sindrômica misturam vários tipos de fissura na avaliação, o que não é o ideal (SLAYTON et al., 2003; RILEY et al., 2007; VIEIRA et al. (a), 2007; PEGELOW et al., 2008; JEHEE et al., 2009; JIA et al., 2009). Neste estudo, foram selecionados indivíduos que apresentassem somente fissura completa de lábio e palato unilateral definindo claramente o fenótipo a ser estudado, uma vez que embriologicamente a formação dessas duas estruturas ocorre em períodos distintos. Assim, a etiologia genética das fissuras pode estar relacionada ao tipo de fissura e estruturas envolvidas.

A amostra do presente estudo foi composta por 45 indivíduos do gênero masculino e 75 do gênero feminino, sendo a média de idade por volta de 28 anos. Quanto à etnia, é difícil em um país como o Brasil, completamente miscigenado, definir a característica étnica de cada participante, assim classificou-se o grupo como população brasileira.

4.3.2 Triagem de mutação nas seqüências obtidas

Apesar das repetições, em até três vezes, no seqüenciamento de algumas amostras, uma porcentagem em cada grupo não pôde ser analisada devido aos resultados insatisfatórios nas seqüências, impossibilitando a leitura. O critério para excluir uma seqüência da análise levou em consideração o grau de confiabilidade da seqüência, apresentado pelo programa de computador, a intensidade do sinal de

cada base e a análise visual do eletroferograma. A porcentagem de amostras seqüenciadas incluídas para análise está disposta na Figura 16.

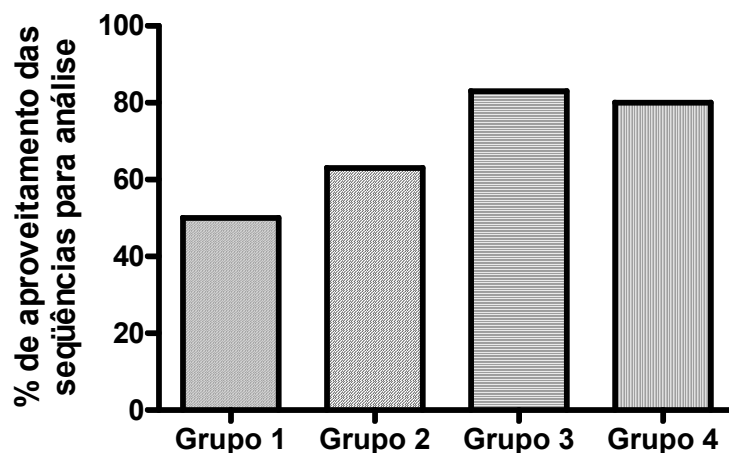


Figura 16 – Gráfico representativo da porcentagem de aproveitamento das seqüências em que foi possível a análise do eletroferograma dos voluntários em cada um dos grupos estudados. Grupo 1 – pacientes com o fenótipo de fissura labiopalatina e agenesia dentária; grupo 2 – pacientes com fenótipo somente de fissura labiopalatina; grupo 3 – voluntários com fenótipo somente de agenesia e grupo 4 – voluntários do grupo controle

Ao analisar esse resultado, chama atenção o fato de que os grupos com menor aproveitamento das seqüências foram os grupos 1 e 2 (ambos apresentavam fissura labiopalatina como parte do fenótipo). Nestes, algumas amostras não foram lidas pelo seqüenciador ou o seqüenciamento estava insatisfatório para responder a pergunta sobre mutação ou polimorfismos. Este resultado é intrigante, sendo necessários experimentos adicionais para explicá-lo. É importante ressaltar que para todas as amostras houve amplificação do éxon 3 por PCR, o que foi constatado pela presença de banda de tamanho esperado (302 pb) no gel de agarose corado com brometo de etídeo.

Das amostras seqüenciadas e analisadas, detectou-se alteração em somente uma amostra do grupo controle. Essa alteração foi verificada no seqüenciamento da fita forward e confirmada pelo seqüenciamento da fita reverse (Figuras 17 e 18). Essa alteração ocorreu na posição 97 a partir da primeira base da primeira metionina da proteína, constatando-se a troca de uma base T por uma base C (c. 97 T>C). Essa alteração promoveu a mudança de aminoácido neste local, do aminoácido S (serina –TCT) pelo aminoácido P (prolina CCT).

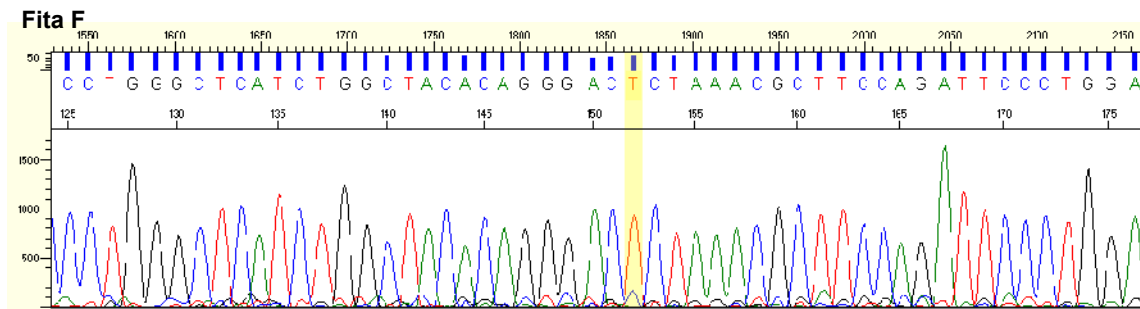


Figura 17 - Eletroferograma da seqüência obtida da fita F do indivíduo que apresentou variação na seqüência, destacando a região alterada com a demarcação em amarelo

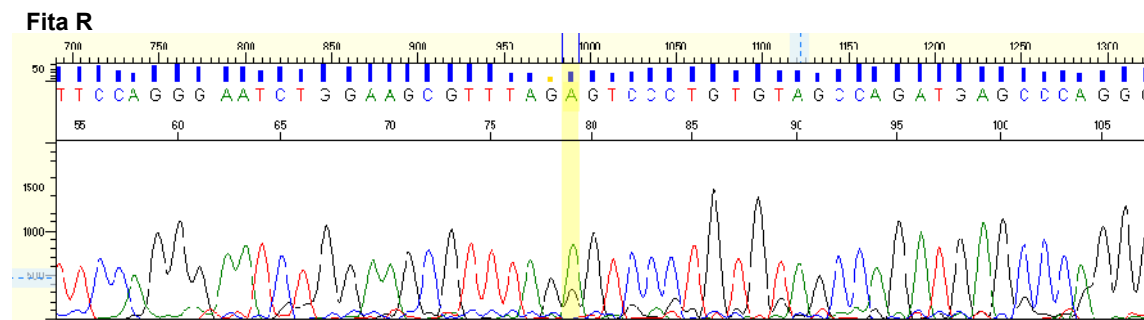


Figura 18 - Eletroferograma da seqüência obtida da fita R, confirmando a F, do indivíduo que apresentou variação na seqüência, destacando a mesma região alterada com a demarcação em amarelo

Nos sites pesquisados para análise de mutações do tipo polimorfismos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>, <http://www.uniprot.org> e <http://genome.ucsc.edu>) foram encontrados 173 polimorfismos descritos nos 9 éxons e 8 íntrons do gene *IRF6*. A mutação encontrada neste estudo foi comparada a esses 173 polimorfismos e não houve semelhança com nenhum deles. Portanto, trata-se de uma variação de seqüência ainda não descrita.

Apesar de ser uma alteração não descrita, por ter sido constatada em indivíduo do grupo controle, possivelmente essa variação de seqüência não esteja relacionada à ocorrência de fissura e agenesia dentária, uma vez que este indivíduo não apresenta os fenótipos em estudo.

Desta forma, neste grupo especificamente não foi encontrada nenhuma alteração no éxon 3 do gene *IRF6* nos probandos com os fenótipos analisados. Logo, neste estudo, o éxon 3 do gene *IRF6* não apresentou associação com os fenótipos “fissura labiopalatina não-sindrômica” e “agenesia dentária”. É importante ressaltar que todos os outros estudos publicados na literatura foram realizados em

diferentes países com diversas populações, o que pode sobremaneira ter interferido nos resultados (SCAPOLI et al., 2005; VIEIRA et al., 2007a; VIEIRA et al., 2007b; VIEIRA et al., 2008c; JUGESSUR et al., 2008; SUAZO et al., 2008; JIA et al., 2009). Os resultados do presente estudo são contrários aos verificados por muitos pesquisadores, que encontraram significativa associação entre polimorfismos e mutações patogênicas no gene *IRF6* e fissura labiopalatina e agenesia dentária (GHASSIBÉ et al., 2005; SCAPOLI et al., 2005; SILVA, 2007; VIEIRA et al., 2007a; VIEIRA et al., 2007b; VIEIRA et al., 2008b; VIEIRA et al., 2008c; JUGESSUR et al., 2008; JEHHE et al., 2009; JIA et al., 2009; HUANG; PAN et al., 2009). Por outro lado, estes resultados corroboram os de outro grupo de pesquisadores, que não verificou essa mesma relação do gene *IRF6* ao fenótipo da fissura labiopalatina não-sindrômica (PEGELow et al., 2008; BIRNBAUM et al., 2008; TANG et al., 2009).

Vale a pena ressaltar que o gene *IRF6* não foi totalmente seqüenciado neste estudo e que o número de voluntários em cada grupo (n=30) é reduzido, o que pode ter interferido nos resultados. Trabalhos complementares já estão programados no laboratório do orientador desta tese para o seqüenciamento de todos os outros éxons do gene *IRF6*, além de outros genes envolvidos nos mesmos fenótipos em um número maior de voluntários.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos com a metodologia utilizada neste estudo, foi possível concluir que:

Não foram encontradas mutações ou polimorfismos no éxon 3 do gene *IRF6* em indivíduos com fissura labiopalatina não-sindrômica e agenesia dentária. Desta forma, neste grupo, não houve associação entre o éxon 3 do gene *IRF6* e os fenótipos analisados.

Em relação ao protocolo padronizado, foi possível realizar, no analisador genético ABI 3130XL, seqüenciamento de DNA genômico extraído a partir de amostras de saliva total, com alto grau de qualidade e confiabilidade.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aidar M, Line S.R.P. A simple and Cost-Effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007;18(2):148-52.

Bailey CM, Abbott DE, Margaryan NV, Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJC. 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(7): 2235-2243.

Bell JR. A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT®. *Biotechniques.* 2008;44(6):834.

Bennet RR, den Dunnen J, O'Brien KF, Darras BT, Kunkel LM. Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing. *BMC Genetics.* 2001;2:17-28.

Bennett RR, Schneider HE, Estrella E, Burgess S, Cheng AS, Barrett C, et al. Automated DNA mutation detection using universal conditions direct sequencing: application to ten muscular dystrophy genes. *BMC Genet.* 2009; 10:66-94.

Bille C, Winther JF, Bautz A, Murray JC, Olsen J, Christensen K. Cancer risk in persons with oral cleft- a population-based study of 8,093 cases. *Am J Epidemiol.* 2005;161(11):1047-55.

Birnbaum S, Reutter H, Lauster C, Scheer M, Schmidt G, Saffar M, et al. 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. Part A.* 2008;146A:787-90.

Bjork BC, Krahn KN, Schutte BC, Murray JC. *IRF6* related disorders. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>. Acesso em: 20 out. 2009.

Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in *IRF6* contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am. J. Med. Genet.* 2005;137A:259-62.

Chapman, R.S., Duff, E.K., Lourenço, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Clarke, A.R., et al. A novel role for *IRF-1* as a supressor of apoptosis. *Oncogene.* 2000; 19(54):6386-91.

Clayton, J.M. Congenital dental anomalies occurring in 3,557 children. *ASDC J Dent Child* 1956;23:206-8. apud Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new

discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000 Jun;117(6):650-6. Review.

Cobourne MT. Familial human hypodontia-is it all in the genes? *Br Dent J.* 2007 Aug 25;203(4):203-8. Review.

Das P, Stockton D W, Bauer C, Shaffer L G, D'Souza RN, Wright JT, Patel PI. Haploinsufficiency of PAX9 is associated with autosomal dominant hypodontia. *Hum Genet.* 2002;110:371-76.

den Dunnen JT, Antonarakis E. Nomenclature for the description of humans sequence variations *Hum Genet.* 2001;109:121-24.

Dugan KA, Lawrence HS, Hares DR, Fisher CL, Budowle B. An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *J Forensic Sci.* 2002;47(4):811-18.

Ghassibé M, Bayet B, Revencu N, Verelle-Dumoulin C , Gillerot Y, Vanwijck R, et al. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population. *European Journal of Human Genetics.* 2005;13:1239-42.

Goldenberger D, Perschil I, Ritzler M, Altwegg M. A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *Genome Res.* 1995; 4: 368-370.

Grosjean J, Hantz S, Cotin S, Baclet MC, Mengelle C, Trapes L, et al. Direct genotyping of citomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva sample. *J Clin Virol.* 2009; in press.

Heliovaara A, Ranta R, Rautio J. Dental abnormalities in permanent dentition in children with submucous cleft palate. *Acta Odontol Scand.* 2004; 62: 129-131.

Hu JC, Simmer JP. Developmental biology and genetics of dental malformations. *Orthod Craniofac Res.* 2007 May;10(2):45-52. Review.

Huang, C.K., Pan, Q. Validation of cystic fibrosis mutation analysis using ABI 3130XL genetic analyzer. *Diagn Mol Pathol.* 2007; 16(1): 57- 59.

Huang Y, Wu J, Ma J, Beaty TH, Sull JW, Zhu L, et al. Association between *IRF6* SNPs and oral clefts in West China. *J Dent Res.* 2009 Aug;88(8):715-18.

Ingraham CR, Kinoshita A, Kondo S, Yang B, Sajan S, et al. Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (*Irf6*). *Nature Genetics*. 2006; 38 (11): 1335-1340.

Jakobsen LP, Ullmann R, Kjaer KW, Knudsen MA, Tommerup N, Eiberg H. Suggestive Linkage to a Neighboring Region of *IRF6* in a Cleft Lip and Palate Multiplex Family. *Am J Med Genet. Part A*. 2007; 143 A: 2716-2721.

Jarman PG, Fentress SL, Katz DE. Mitochondrial DNA validation in a State laboratory. *J Forensic Sci*. 2009; 54 (1): 95-102.

Jehee FS, Burin BA, Rocha KM, Zechi-Ceide R, Bueno DF, Brito L, et al. Novel Mutations in *IRF6* in nonsyndromic Cleft lip with or without cleft palate: when should *IRF6* mutational screening be done? *Am J Med Genet. Part A*. 2009;149 A:1319-22.

Jezewski PA., Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, et al. Complete sequencing shows a role for *MSX1* in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet*. 2003 Jun; 40(6): 399-407.

Jia Z, Yang L, Li L, Wu J, Zhu L, Yang C, et al. Association among *IRF6* polymorphism, environmental, factors, and nonsyndromic orofacial clefts in Western China. *DNA and Cell biology*. 2009;28(5):249-57.

Jugessur A, Rahimov F, Lie RT, Wilcox AJ, Gjessing HK, Nilsen RM, et al. Genetic variants in *IRF6* and the risk os 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.

Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, et al. Genetic Determinants of Facial Clefting: Analysis of 357 Candidate Genes Using Two National Cleft Studies from Scandinavia. *PlosOne*. 2009;4(4):e5385.

Kapadia H, Frazier-Bowers S, Ogawa T, D'Souza RN. Molecular characterization of a novel *PAX9* missense mutation causing posterior tooth agenesis. *Europ J Hum. Genet*. 2006;14:403-09.

Kapadia H, Mues G., D'Souza R. Genes affecting tooth morphogenesis. *Orthod Craniofac Res*. 2007 Nov;10(4):237-44.

Karger, B.L., Guttman, A. DNA Sequencing by CE. *Eletrophoresis*. 2009;30: 196-202.

Kjaer I. Can the location of tooth agenesis and the location of initial bone loss seen in juvenile periodontitis be explained by neural developmental fields in the jaws? *Acta Odontol Scand.* 1997;55:70-2. apud Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000 Jun;117(6):650-6. Review.

Knight AS, Schutte BC, Jiang R, Dixon MJ. Developmental expression analysis of the mouse and chick orthologues of *IRF6*: the gene mutated in Van der Woude syndrome. *Dev Dyn.* 2006; 235:1441-47.

Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight A S, Watanabe Y, et al. Mutations in *IRF6* cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. (Letter) *Nature Genet.* 2002;32:285-289.

Küchler EC, Risso PA, Costa M de C, Modesto A , Vieira AR. Studies of dental anomalies in a large group of school children. *Arch Oral Biol.* 2008 Oct;53(10):941-46.

Lammi L, Halonen K, Pirinen S, Thesleff I, Arte S, Nieminen P. A missense mutation in *PAX9* in a family with distinct phenotype of oligodontia. *Europ J Hum Genet.* 2003;11:866-871.

Larson M, Hellquist R, Jakobson OP. Dental abnormalities and ectopic eruption in patients with isolated cleft palate. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1998;32:203-212.

Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, McHenry TG. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype specific differences in linkage and association results. *Hum Hered.* 2009 ;68(3):151-70.

Matalova E, Fleischmannova J, Sharpe PT, Tucker AS. Tooth agenesis: from Molecular Genetics to Molecular Dentistry. *J Dent Res.* 2008;87(7):617-23.

Messana I, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Castagnola M. Facts and artifacts in proteomics of body fluids. What proteomics of saliva is telling us? *J Sep Sci.* 2008;31:1948-63.

Milos PM. Emergence of single-molecule sequencing and potential for molecular diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diag.* 2009;9(7):659-66.

Montandon EM, Duarte RC, Furtado PGC. Prevalência de doenças bucais em crianças portadoras de fissura lábio palatinas. *J Bras Odontop Odontologia Bebês.* 2001;4:68-73.

Mostowska A, Kobiela A, Trzeciak WH. Molecular basis of non-syndromic tooth agenesis: mutations of *MSX1* and *PAX9* reflect their role in patterning human dentition. *Eur J Oral Sci.* 2003;111:365-70.

Murray JC. Face Facts: Genes, Environment and Clefts. *Am J Hum Genet.* 1995; 57:227-32.

Nieminen P, Kotilainen J, Aalto Y, Knuutila S, Pirinen S, Thesleff I. *MSX1* gene is deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome patients with oligodontia. *J Dent Res.* 2003 Dec;82(12):1013-17.

Nopoulos P, Langbehn DR, Canady J, Magnotta V, Richman L. Abnormal brain structure in children with isolated clefts of the lip or palate. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007;161(8):753-58.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: National Center for Biotechnology Information (NCBI) <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>. Acesso em: 20 out. 2009.

Paranaíba LMR, Martelli-Junior H, Swerts MSO, Line SRP, Coletta RD. Novel Mutation in the *IRF6* gene in Brazilian families with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med.* 2008;22:507-11.

Paranaíba LM, Bufalino A, Martelli-Júnior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD. Lack of association between *IRF6* polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis.* 2009 Sep 23. In press. (html)

Pardo RA, Castillo S, Vieira AR. Estudio genético de una familia chilena con tres fenotipos dentales diferentes. *Rev Méd Chile.* 2006;134:1541-48.

Paun A, Pitha PM. The IRF family, revisited. *Biochimie.* 2007;89(6-7):744-53.

Pegelow M, Peyrard-Janvid M, Zucchelli M, Fransson I, Larson O, Kere J, et al. Familial non-syndromic cleft lip and palate – analysis of the *IRF6* gene and clinical phenotypes. *European Journal of Orthodontics.* 2008;30:169-75.

Peres RCR, Scarel-Caminaga RM, Espírito Santo AR, Line SRP. Association between *PAX-9* promoter polymorphisms and hypodontia in humans. *Arch Oral Biol.* 2005;50:861-871.

Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchle MJ, Rubini M, et al. Disruption of an AP-2alpha binding site in an *IRF6* enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet.* 2008 Nov;40(11):1341-7.

Ranta R, Stegars T, Rintala A. Correlations of hypodontia in children with isolated cleft palate. *J. Cleft Palate.* 1983;20:163-165.

Richardson RJ, Dixon J, Jiang R, Dixon MJ. Integration of *IRF6* and Jagged2 signalling is essential for controlling palatal adhesion and fusion competence. *Hum Mol Genet.* 2009;18(4):2632-2642.

Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, Russo ET, et al. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104 (11):4512-17.

Sakai VT, Campos MR, Machado MA, Lauris JR, Greene AS., Santos CF. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1- year longitudinal study. *Int J Paediatr Dent.* 2007; 17(3): 192-99.

Santos CF, Oliveira EB, Salgado MC, Greene AS. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, na angiotensin II-forming enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 39(5): 628-35.

Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, et al. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the *IRF6* locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am. J. Hum. Genet.* 2005;76:180-183.

Schliekelman P, Slatkin M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying in inherited disease. *Am J Hum Genet.* 2002;71:1369-85.

Silva AL. Análise dos genes candidatos para fissuras orais não sindrômicas em famílias com recorrência [tese]. Botucatu (SP): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2007.

Slayton RL, Williamsn L, Murray JC, Wheeler JJ, Lidral AC, Nishimura CJ. Genetic association studies of cleft lip and/or palate with Hypodontia outside the cleft region. *Cleft Palate Craniofacial J.* 2003;40(3):274-79.

Srichomthong C, Siriwan P, Shotelersuk V. Significant association between *IRF6* 820GRA and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Thai population. *J Med Genet.* 2005;42:1-4.

- Stockton D W, Das P, Goldenberg M, D'Souza R N, Patel P I. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. (Letter) *Nature Genet.* 2000;24:18-19.
- Suazo J, Santos JL, Jará L, Blanco R. Linkage disequilibrium between *IRF6* variants and nonsyndromic cleft lip/palate in the Chilean population. *Am J Med Genet. Part A.* 2008;146A:2706-08.
- Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, Fallin MD, Ingersoll RG, Park J, et al. Maternal transmission effects of the PAX genes among cleft case–parent trios from four populations. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(6):831-39.
- Svinhufvud E, Myllarniemi S, Norio R. Dominant inheritance of tooth malpositions and their association to hypodontia. *Clin Genet* 1988;34:373-81. apud Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000 Jun;117(6):650-6. Review.
- Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T. Interferon Regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Câncer Sci.* 2008;99(3):467-78.
- Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu. Rev Immunol.* 2008;26:535-84.
- Tang W, Du X, Feng F, Long J, Lin Y, L, L, et al. Association analyses between the *IRF6* G820A polymorphism and nonsyndromic cleft lip and/or palate in Chinese population. *Cleft Palate Craniofacial J.* 2009;46(1):89-92.
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. *IRF6* family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:623-655.
- Ten Cate AR. *Histologia Bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001.
- Thesleff I. The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am J Med Genet. Part A.* 2006;140:2530-35.
- van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):342-3.
- Vanzin GD, Yamazaki K. Prevalência de anomalias dentárias de número em pacientes portadores de fissura de lábio e palato. *Rev Odonto Ciência.* 2002; 17:49-56.

Vastardis H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000 Jun;117(6):650-6. Review.

Vieira AR. Oral clefts and syndromic forms of tooth agenesis as models for genetics of isolated tooth agenesis. *J Dent Res.* 2003 Mar;82(3):162-5.

Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray JC. *MSX1*, *PAX9* and *TGFA* contribute to tooth agenesis in humans. *J Dent Res.* 2004;83(9):723-27.

Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, et al. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.* 2005 Dec;1(6):651-659.

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. Part A.* 2007;143A:2075-78. (a)

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 Part A.* 2007;143 A:538-45. (b)

Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008;87(2):119-25. (a)

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. A genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am J Med Genet. Part A.* 2008;146 A(11):1406-13. (b)

Vieira AR, Seymen F, Patir A, Menezes R. Evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the *IRF6* locus and isolated tooth agenesis, in a Turkish population. *Arch Oral Biol.* 2008;53:780-84. (c)

Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility gene for clefts. *Genet Med.* 2008;10(9):668-74. (d)

Washbourne BJ, Cox TC. Expression profiles of *cIRF6*, *cLHX6* and *cLHX7* in the facial primordia suggest specific roles during primary palatogenesis. *BMC Developmental Biology.* 2006;6(18):1-7.

Yang Y, Hebron R, Hang J. A method for preparing DNA sequencing templates using a DNA – binding microplate. *J Biomol Tech.* 2009;20:165-71.

Zhao J, Chen Y, Bao L, Xia Q, Wu T, Zhou L. Novel mutations of PAX9 gene in Chinese patients with oligodontia. *Chinese J. Stomat.* 2005;40:266-70.

Zucchero T M, Cooper M E, Maher B S, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, et al. Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *New Eng J Med.* 2004;351(8):769-80.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Quantificação e qualificação do DNA extraído a partir de saliva

Número da amostra	ng/uL	A260 nm	A280 nm	260 nm/280 nm
1	239,23	4,785	2,776	1,72
2	80,46	1,609	1,019	1,58
3	357,28	7,146	3,828	1,87
4	277,2	5,544	3,01	1,84
5	136,09	2,722	1,75	1,56
6	176,22	3,524	2,121	1,66
7	151,03	3,021	1,948	1,55
8	247,62	4,952	2,782	1,78
9	185,74	3,715	2,262	1,64
10	200,34	4,007	2,832	1,41
11	112,53	2,251	1,509	1,49
12	149,73	2,995	1,943	1,54
13	72,38	1,448	0,991	1,46
14	71,98	1,44	0,936	1,54
15	803,31	16,066	8,755	1,84
16	155,39	3,108	1,779	1,75
17	74,66	1,493	0,89	1,68
18	241,71	4,834	2,867	1,69
19	202,91	4,058	2,311	1,76
20	195,9	3,918	2,062	1,9
21	243,73	4,875	2,842	1,72
22	154,7	3,094	2,374	1,3
23	174,75	3,495	2,186	1,6
24	199,89	3,998	2,49	1,61
25	297,98	5,96	3,207	1,86
26	81,08	1,622	1,259	1,29
27	108,08	2,162	1,219	1,77
28	30,02	0,6	0,399	1,5
29	178,81	3,576	2,071	1,73
30	162,15	3,243	1,928	1,68
31	85,17	1,703	0,986	1,73
32	153,07	3,061	1,778	1,72
33	292,63	5,853	3,348	1,75
34	137,58	2,752	1,894	1,45
35	304,95	6,099	3,449	1,77
36	167,69	3,354	1,912	1,75
37	132,1	2,642	1,677	1,58
38	79,95	1,599	1,05	1,52
39	3,15	0,063	0,057	1,1
40	24,21	0,484	0,327	1,48
41	63,85	1,277	0,867	1,47
42	29,23	0,585	0,38	1,54

43	81,57	1,631	1,165	1,4
501	139	2,78	1,505	1,85
502	30,93	0,619	0,472	1,31
503	160,63	3,213	2,074	1,55
503	162,43	3,249	2,082	1,56
504	289,8	5,796	3,08	1,88
505	75,23	1,505	0,916	1,64
506	25,88	0,518	0,371	1,4
506	25,67	0,513	0,359	1,43
507	9,78	0,196	0,13	1,5
508	7,39	0,148	0,146	1,01
509	79,67	1,593	1,165	1,37
510	81,45	1,629	1,132	1,44
511	99,26	1,985	1,427	1,39
512	87,98	1,76	1,155	1,52
513	190,52	3,81	2,259	1,69
514	84,58	1,692	1,238	1,37
515	484,2	9,684	5,227	1,85
516	62,1	1,242	0,837	1,48
517	573,87	11,477	6,315	1,82
518	166,06	3,321	1,824	1,82
519	31,37	0,627	0,551	1,14
520	957,84	19,157	12,084	1,59
521	86,29	1,726	1,185	1,46
522	193,88	3,878	2,695	1,44
523	212,31	4,246	2,465	1,72
524	52,03	1,041	0,686	1,52
525	158,6	3,172	2,083	1,52
526	56,22	1,124	0,792	1,42
527	68,71	1,374	0,878	1,57
528	7,73	0,155	0,118	1,31
529	16,67	0,333	0,267	1,25
530	53,73	1,075	0,867	1,24
531	41,92	0,838	1,222	0,69
532	55	1,1	0,969	1,14
533	476,47	9,529	5,19	1,84
534	205,5	4,11	2,254	1,82
535	357,84	7,157	3,78	1,89
536	200,86	4,017	2,201	1,83
537	73,43	1,469	0,894	1,64
538	18,6	0,372	0,3	1,24
538	18,32	0,366	0,299	1,23
539	83,19	1,664	1,074	1,55
540	118,82	2,376	1,343	1,77
541	84,24	1,685	1,058	1,59
542	171,58	3,432	2,591	1,32

543	184,23	3,685	2,454	1,5
544	45,51	0,91	0,749	1,21
545	135,98	2,72	1,873	1,45
546	104,66	2,093	1,328	1,58
547	30,31	0,606	0,405	1,5
548	20,02	0,4	0,338	1,18
549	111,3	2,226	1,501	1,48
550	91,04	1,821	1,279	1,42
551	32,92	0,658	0,418	1,58
552	44,78	0,896	0,63	1,42
553	92,63	1,853	1,26	1,47
554	25,41	0,508	0,487	1,04
1001	155,16	3,103	2,128	1,46
1001	NaN	NaN	NaN	NaN
1002	110,7	2,214	1,719	1,29
1003	110,1	2,202	1,677	1,31
1004	458,03	9,161	6,414	1,43
1005	397,74	7,955	5,333	1,49
1005	875,73	17,515	14,657	1,19
1006	144,68	2,894	2,008	1,44
1007	62,78	1,256	1,221	1,03
1008	128,43	2,569	2,071	1,24
1009	111,18	2,224	1,602	1,39
1010	164,81	3,296	2,816	1,17
1011	160,38	3,208	2,15	1,49
1012	168,05	3,361	2,614	1,29
1013	121,96	2,439	1,679	1,45
1014	287,93	5,759	4,888	1,18
1015	385,5	7,71	4,656	1,66
1016	125,52	2,51	1,877	1,34
1017	239,51	4,79	3,535	1,35
1018	667,63	13,353	8,502	1,57
1019	43,28	0,866	0,736	1,18
1020	34,61	0,692	0,727	0,95
1021	124,48	2,49	2,248	1,11
1022	69,58	1,392	1,156	1,2
1023	74,41	1,488	1,172	1,27
1024	125,3	2,506	2,171	1,15
1024	138,68	2,774	2,429	1,14
1025	283,06	5,661	3,714	1,52
1026	190,58	3,812	2,902	1,31
1027	121,11	2,422	2,045	1,18
1028	189,93	3,799	2,652	1,43
1029	438,17	8,763	5,731	1,53
1030	76,07	1,521	1,052	1,45
1031	114,61	2,292	1,679	1,37

1032	636,68	12,734	7,253	1,76
1033	79,75	1,595	1,366	1,17
1034	114,92	2,298	1,703	1,35
1035	378,09	7,562	5,219	1,45
1036	209,92	4,198	3,147	1,33
1037	295,12	5,902	4,52	1,31
1038	75,16	1,503	1,394	1,08
1039	357,83	7,157	4,789	1,49
1040	348,56	6,971	4,638	1,5
1041	483,13	9,663	5,201	1,86
1042	880,34	17,607	11,147	1,58
1043	165,35	3,307	2,041	1,62
1044	58,24	1,165	0,818	1,42
1045	283,41	5,668	2,93	1,93
1046	183,9	3,678	2,238	1,64
1047	1766,22	35,324	18,165	1,94
1048	88,53	1,771	1,302	1,36
1049	266,72	5,334	3,039	1,76
1050	134,65	2,693	1,708	1,58
2001	62,7	1,254	0,771	1,63
2002	75,74	1,515	1,048	1,44
2003	159,49	3,19	1,753	1,82
2004	192,85	3,857	2,058	1,87
2005	61,67	1,233	0,768	1,61
2006	39,17	0,783	0,55	1,42
2007	11,56	0,231	0,175	1,33
2008	32,34	0,647	0,861	0,75
2009	95,42	1,908	1,038	1,84
2010	60,5	1,21	0,702	1,72
2011	58,81	1,176	0,746	1,58
2012	92,46	1,849	1,255	1,47
2013	127,37	2,547	1,521	1,68
2014	135,76	2,715	1,711	1,59
2015	233,05	4,661	2,707	1,72
2016	174,77	3,495	1,979	1,77
2017	126,24	2,525	1,516	1,67
2018	412,69	8,254	4,514	1,83
2019	57,23	1,145	0,723	1,58
2020	26,69	0,534	0,391	1,36
2021	383,9	7,678	4,674	1,64
2022	120,88	2,418	1,505	1,61
2023	109,65	2,193	1,365	1,61
2024	45,15	0,903	0,611	1,48
2025	23,94	0,479	0,359	1,34
2026	340,89	6,818	4,306	1,58
2027	250,51	5,01	2,853	1,76

2028	152,29	3,046	1,792	1,7
2029	259,86	5,197	2,802	1,86
2030	37,79	0,756	0,593	1,28
2031	58,83	1,177	0,804	1,46
2032	267,06	5,341	3,738	1,43
2033	49,34	0,987	0,747	1,32
2034	59,69	1,194	0,857	1,39
2035	6,79	0,136	0,175	0,78
2036	248,56	4,971	2,839	1,75
2037	276,5	5,53	3,207	1,72
2038	61,46	1,229	0,856	1,44
2039	66,87	1,337	0,795	1,68
2040	47,01	0,94	0,674	1,4
2041	134,58	2,692	1,585	1,7
2042	103,82	2,076	1,39	1,49

APÊNDICE B – Quantificação e qualificação do produto da PCR do éxon 3 do gene *IRF6* após purificação

Número da amostra	ng/uL	A260 nm	A280 nm	260 nm / 280 nm
15 purif IRF6 E3	15,6	0,312	0,15	2,09
17 purif IRF6 E3	12,84	0,257	0,127	2,02
20 purif IRF6 E3	12,39	0,248	0,13	1,9
23 purif IRF6 E3	18,19	0,364	0,17	2,14
24 purif IRF6 E3	13,88	0,278	0,149	1,86
25 purif IRF6 E3	16,46	0,329	0,144	2,29
27 purif IRF6 E3	14,11	0,282	0,139	2,04
30 purif IRF6 E3	15,26	0,305	0,152	2,01
32 purif IRF6 E3	13,69	0,274	0,151	1,81
33 purif IRF6 E3	16,97	0,339	0,169	2
34 purif IRF6 E3	17,35	0,347	0,18	1,93
36 purif IRF6 E3	7,54	0,151	0,1	1,5
39 purif IRF6 E3	15,97	0,319	0,163	1,96
40 purif IRF6 E3	17,95	0,359	0,171	2,09
41 purif IRF6 E3	4,56	0,091	0,058	1,58
44 purif IRF6 E3	26,37	0,527	0,296	1,78
45 purif IRF6 E3	16,77	0,335	0,156	2,16
46 purif IRF6 E3	73,71	1,474	0,742	1,99
47 purif IRF6 E3	44,72	0,894	0,428	2,09
47 purif IRF6 E3	43,92	0,878	0,436	2,02
48 purif IRF6 E3	36,95	0,739	0,364	2,03
49 purif IRF6 E3	21,16	0,423	0,211	2,01
50 purif IRF6 E3	22,74	0,455	0,225	2,02
502 purif IRF6 E3	14,43	0,289	0,141	2,04
503 purif IRF6 E3	7,27	0,145	0,08	1,82
504 purif IRF6 E3	9,45	0,189	0,104	1,81
505 purif IRF6 E3	16,16	0,323	0,186	1,74
506 purif IRF6 E3	14,15	0,283	0,144	1,97
507 purif IRF6 E3	6,92	0,138	0,076	1,83
508 purif IRF6 E3	15,93	0,319	0,16	1,99
509 purif IRF6 E3	21,42	0,428	0,216	1,98
51 purif IRF6 E3	22,39	0,448	0,232	1,93
510 purif IRF6 E3	13,17	0,263	0,125	2,1
511 purif IRF6 E3	17,08	0,342	0,172	1,98
511 purif IRF6 E3	14,92	0,298	0,152	1,96
512 purif IRF6 E3	14,88	0,298	0,14	2,13
513 purif IRF6 E3	14,66	0,293	0,15	1,96
514 purif IRF6 E3	13,5	0,27	0,131	2,07
515 purif IRF6 E3	9,96	0,199	0,096	2,08
516 purif IRF6 E3	15,03	0,301	0,145	2,07
517 purif IRF6 E3	14,8	0,296	0,148	1,99
518 purif IRF6 E3	19,04	0,381	0,196	1,95

519 purif IRF6 E3	13,03	0,261	0,145	1,79
520 purif IRF6 E3	17,83	0,357	0,181	1,97
521 purif IRF6 E3	16,83	0,337	0,167	2,02
522 purif IRF6 E3	21,78	0,436	0,215	2,02
524 purif IRF6 E3	11,98	0,24	0,113	2,13
526 purif IRF6 E3	22,83	0,457	0,222	2,06
528 purif IRF6 E3	20,05	0,401	0,197	2,03
529 purif IRF6 E3	15,05	0,301	0,151	2
532 purif IRF6 E3	18,55	0,371	0,186	2
537 purif IRF6 E3	15,61	0,312	0,151	2,07
539 purif IRF6 E3	21,34	0,427	0,221	1,93
542 purif IRF6 E3	22,31	0,446	0,231	1,93
543 purif IRF6 E3	37,4	0,748	0,397	1,88
544 purif IRF6 E3	22,02	0,44	0,219	2,01
545 purif IRF6 E3	18,44	0,369	0,174	2,12
546 purif IRF6 E3	21,17	0,423	0,219	1,94
1001 purif IRF6 E3	15,88	0,318	0,155	2,05
1002 purif IRF6 E3	22,52	0,45	0,222	2,03
1003 purif IRF6 E3	21,23	0,425	0,197	2,16
1004 purif IRF6 E3	22,42	0,448	0,201	2,24
1005 purif IRF6 E3	20,27	0,405	0,193	2,1
1006 purif IRF6 E3	25,02	0,5	0,242	2,07
1008 purif IRF6 E3	11,8	0,236	0,129	1,83
1010 purif IRF6 E3	18,25	0,365	0,176	2,08
1011 purif IRF6 E3	19,99	0,4	0,195	2,05
1012 purif IRF6 E3	15,32	0,306	0,136	2,26
1013 purif IRF6 E3	17,48	0,35	0,182	1,92
1014 purif IRF6 E3	20,77	0,415	0,19	2,18
1016 purif IRF6 E3	15,98	0,32	0,16	1,99
1017 purif IRF6 E3	20,14	0,403	0,195	2,07
1019 purif IRF6 E3	17,87	0,357	0,186	1,92
1019 purif IRF6 E3	11,74	0,235	0,131	1,8
1021 purif IRF6 E3	11,79	0,236	0,105	2,25
1022 purif IRF6 E3	13,72	0,274	0,135	2,03
1024 purif IRF6 E3	13,23	0,265	0,142	1,86
1025 purif IRF6 E3	1,41	0,028	0,012	2,39
1025 purif IRF6 E3	1,93	0,039	0,034	1,15
1026 purif IRF6 E3	12,5	0,25	0,106	2,37
1028 purif IRF6 E3	14,52	0,29	0,143	2,03
1029 purif IRF6 E3	18,15	0,363	0,191	1,9
1033 purif IRF6 E3	9,25	0,185	0,082	2,26
1033 purif IRF6 E3	9,15	0,183	0,089	2,05
1034 purif IRF6 E3	12,78	0,256	0,112	2,27
1034 purif IRF6 E3	7,71	0,154	0,079	1,94
1040 purif IRF6 E3	12,55	0,251	0,149	1,69
1041 purif IRF6 E3	16,22	0,324	0,174	1,86

1042 purif IRF6 E3	11,77	0,235	0,14	1,68
1043 purif IRF6 E3	9,28	0,186	0,087	2,14
1046 purif IRF6 E3	13,82	0,276	0,139	1,99
1048 purif IRF6 E3	11,47	0,229	0,102	2,24
1049 purif IRF6 E3	17,17	0,343	0,164	2,1
1050 purif IRF6 E3	21,73	0,435	0,231	1,88
2003 purif IRF6 E3	16,29	0,326	0,165	1,98
2005 purif IRF6 E3	19,84	0,397	0,2	1,99
2006 purif IRF6 E3	16,34	0,327	0,174	1,88
2007 purif IRF6 E3	10,59	0,212	0,115	1,84
2008 purif IRF6 E3	11,95	0,239	0,133	1,8
2010 purif IRF6 E3	13,83	0,277	0,135	2,05
2011 purif IRF6 E3	12,31	0,246	0,13	1,9
2012 purif IRF6 E3	12,06	0,241	0,125	1,94
2015 purif IRF6 E3	13,13	0,263	0,132	1,99
2019 purif IRF6 E3	12,54	0,251	0,12	2,09
2020 purif IRF6 E3	13,68	0,274	0,153	1,79
2021 purif IRF6 E3	14,63	0,293	0,141	2,07
2022 purif IRF6 E3	11,91	0,238	0,109	2,18
2030 purif IRF6 E3	12,45	0,249	0,125	2
2035 purif IRF6 E3	13,05	0,261	0,133	1,97
2039 purif IRF6 E3	13,85	0,277	0,139	1,99
2043 purif IRF6 E3	32,55	0,651	0,336	1,94
2044 purif IRF6 E3	20,04	0,401	0,208	1,93
2045 purif IRF6 E3	14,47	0,289	0,16	1,8
2046 purif IRF6 E3	34,01	0,68	0,347	1,96
2047 purif IRF6 E3	17,72	0,354	0,167	2,12
2049 purif IRF6 E3	49,4	0,988	0,525	1,88
2054 purif IRF6 E3	18,52	0,37	0,173	2,14
2055 purif IRF6 E3	21,1	0,422	0,25	1,69
2056 purif IRF6 E3	43,19	0,864	0,447	1,93

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

_____, portador da cédula de identidade _____, responsável pelo paciente
 *, _____, após leitura minuciosa deste documento, devidamente explicado pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa: **“Triagem de mutação no gene *IRF6* em indivíduos com fissura de lábio e palato e agenesia dentária”**, realizada por Lucimara Teixeira das Neves CRO 50962 sob orientação do Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos no. do Conselho (CRO) 49884, **que tem como objetivo: Analisar, por meio da coleta de saliva, o gene *IRF6* que caso apresente alguma mutação ou alteração pode estar relacionado com a ocorrência da fissura e ausência congênita dos dentes. A coleta da saliva será realizada uma única vez e por não ser um procedimento invasivo não causa riscos em potencial para a pessoa que aceitar fazer parte do estudo.**

"Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC/USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 no Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão ou pelo telefone (14) 3235-8421".

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 10 do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de .

Assinatura do Sujeito da Pesquisa/responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

* A SER PREENCHIDO, SE O SUJEITO DA PESQUISA NÃO FOR O PACIENTE

Nome do pesquisador Responsável: Lucimara Teixeira das Neves
 Endereço do pesquisador responsável: Rua Silvio Marchione 3-20
 Cidade: Bauru Estado: SP CEP: 17100-000
 Telefone: (014) 3235 8141 e-mail: lucimaraneves@usp.br
 Endereço Institucional: Alameda Otávio Pinheiro Brizola 9-70
 Departamento de Farmacologia
 Cidade: Bauru Estado: SP CEP: 17100-000