



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

IRF6 polymorphisms in Brazilian patients with non-syndromic cleft lip with or without palate☆



João Felipe Bezerra ^a, Heglayne Pereira Vital da Silva ^a,
Raul Hernandes Bortolin ^{a,b}, André Ducati Luchessi ^a,
Marcela Abbott Galvão Ururahy ^a, Melina Bezerra Loureiro ^a,
Vera Lúcia Gil-da-Silva-Lopes ^c, Maria das Graças Almeida ^a,
Viviane Souza do Amaral ^d e Adriana Augusto de Rezende ^{a,*}

^a Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Natal, RN, Brasil

^b Universidade de São Paulo (USP), Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, São Paulo, SP, Brasil

^c Universidade Estadual de Campinas, Escola de Ciências Médicas, Departamento de Genética Médica, Campinas, SP, Brasil

^d Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Biologia Celular e Genética, Lagoa Nova, Natal, RN, Brasil

Recebido em 29 de julho de 2018; aceito em 17 de abril de 2019

Disponível na Internet em 17 de outubro de 2020

KEYWORDS

Nonsyndromic
orofacial clefts;
Etiology;
IRF6;
Single nucleotide
polymorphism

Abstract

Introduction: Non-syndromic orofacial clefts have a complex etiology due to the contribution from both genetic and environmental risk factors, as well as the interaction between them. Among the more than 15 susceptibility loci for non-syndromic orofacial clefts with considerable statistical and biological support, the IRF6 is the most validated gene by the majority of studies. Nonetheless, in genetically heterogeneous populations such as Brazilian, the confirmation of association between non-syndromic orofacial clefts and IRF6 common variants is not a consolidated fact and unrecognized IRF6 variants are poorly investigated.

Objective: The aim of this study was to investigate the association of IRF6 polymorphisms with non-syndromic orofacial clefts development in a population from northeast Brazil.

Methods: Blood samples of 186 non-syndromic orofacial clefts patients and 182 controls from Rio Grande do Norte, Brazil, were obtained to analyze IRF6 polymorphisms (rs2235371, rs642961, rs2236907, rs861019, and rs1044516) by real-time polymerase chain reaction. Non-syndromic orofacial clefts patients were classified in cleft lip and palate, cleft palate only and cleft lip only groups.

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2019.04.011>

☆ Como citar este artigo: Bezerra JF, Silva HP, Bortolin RH, Luchessi AD, Ururahy MA, Loureiro MB, et al. IRF6 polymorphisms in Brazilian patients with non-syndromic cleft lip with or without palate. Braz J Otorhinolaryngol. 2020;86:696–702.

* Autor para correspondência.

E-mail: adriarezende@yahoo.com (A.A. Rezende).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

PALAVRAS-CHAVE

Fendas orofaciais não
sindrômicas;
Etiologia;
IRF6;
Polimorfismo de um
único nucleotídeo

Results: The genotype and allele frequencies of single nucleotide polymorphism rs2235371 in IRF6 showed significant differences in patients with cleft palate when compared to the controls, whereas no association was shown between rs642961, rs2236907, rs861019, and rs1044516 and non-syndromic orofacial clefts.

Conclusion: The association found between rs2235371 and isolated cleft palate should be interpreted with caution due to the low number of individuals investigated, and more studies with larger sample size are needed to confirm these association. In addition, there is a lack of association of the rs642961, rs2236907 and rs861019 polymorphisms with non-syndromic orofacial clefts susceptibility.

© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Polimorfismos do gene IRF6 em pacientes brasileiros com fenda labial não síndrômica com ou sem fenda palatina

Resumo

Introdução: As fendas orofaciais não síndrômicas possuem uma etiologia complexa devido à contribuição de fatores de risco genéticos e ambientais, assim como a interação entre eles. Dentre os mais de 15 loci de susceptibilidade para as fendas orofaciais não síndrômicas com considerável suporte estatístico e biológico, o IRF6 é o gene mais validado pela maioria dos estudos. Apesar disso, em populações geneticamente heterogêneas como a brasileira, a confirmação da associação entre as fendas orofaciais não síndrômicas e as variantes mais comuns do IRF6 ainda não é um fato consolidado e outras variantes não tão conhecidas IRF6 são pouco investigadas. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi investigar a associação de variados polimorfismos do IRF6 com o desenvolvimento das fendas orofaciais não síndrômicas em uma população do nordeste do Brasil.

Método: Amostras de sangue de 186 pacientes com fendas orofaciais não síndrômicas e 182 controles do estado do Rio Grande do Norte, Brasil, foram obtidas para analisar os polimorfismos do IRF6 (rs2235371, rs642961, rs2236907, rs861019 e rs1044516) por reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os pacientes com fendas orofaciais não síndrômicas foram classificados em fenda labiopalatina, fenda palatina isolada e fenda labial isolada.

Resultados: As frequências genotípica e alélica do polimorfismo de único nucleotídeo rs2235371 no IRF6 mostraram-se significativamente diferentes em pacientes com fenda palatina isolada quando comparadas às dos controles, enquanto que nenhuma associação foi encontrada entre rs642961, rs2236907, rs861019 e rs1044516 e risco para o desenvolvimento das fendas orofaciais não síndrômicas.

Conclusão: A associação encontrada entre rs2235371 e fenda palatina isolada deve ser interpretada com cautela devido ao baixo número de indivíduos investigados, sendo necessários mais estudos com um tamanho amostral maior para confirmar essa associação. Além disso, não foram encontradas associações significativas entre os demais polimorfismos do IRF6 rs642961, rs2236907, rs861019 e rs1044516 e a susceptibilidade às fendas orofaciais não síndrômicas.

© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

As fendas orofaciais (FO) são o maior grupo de malformações craniofaciais em humanos e constituem um importante problema de saúde pública, devido às ramificações médicas, psicológicas, sociais e econômicas.¹⁻³ As FO incluem três categorias gerais: aquelas que afetam apenas o lábio (FL), aquelas que afetam o lábio e o palato (FLP) e aquelas que afetam apenas o palato (FP).⁴ No entanto, estudos genéticos e embriológicos prévios sugeriram que a FL e a FP, coletivamente conhecidas como FLP, têm mecanismos etiológicos distintos quando comparados com a FP.^{5,6} As FO são caracterizadas por formação ou fusão incompleta de estruturas que

separam as cavidades nasais e orofaríngeas e podem afetar o lábio superior, o palato duro e/ou mole e outras partes da face.⁷

A maioria dos FO não está associada a malformações ou anomalias adicionais e, portanto, são classificadas como FO não síndrômicas (FONS). Apesar da importante influência de fatores de risco ambientais, como o consumo materno de álcool e cigarros, os fatores genéticos têm a maior contribuição etiológica para as FONS. De fato, os primeiros estudos de Fogh-Anderson e subsequente análise de segregação e estudos com gêmeos demonstraram uma alta taxa de ocorrência familiar, com uma taxa de concordância

de 40% a 60% em gêmeos monozigóticos e 3% a 5% em gêmeos dizigóticos.^{8,9}

Até hoje, já houve suporte estatístico e biológico considerável para mais de 15 *loci* de susceptibilidade para FONS. Desses, 1q32, inclusive o fator regulador de interferon 6 (IRF6), que foi inicialmente identificado em estudos de genes candidatos,¹⁰ e é o *locus* mais validado em estudos de associação genômica ampla (GWAS, *Genome-Wide Association Studies*) de FONS.¹¹ Além disso, mutações estruturais no IRF6 também podem causar as síndromes de Van der Woude e do pterígio poplíteo.¹² Análises de modelos animais indicam que o IRF6 desempenha um papel importante no desenvolvimento facial, participam da proliferação e diferenciação de queratinócitos durante a formação da periderme oral e sua regulação espacial-temporal é essencial para a fusão palatina adequada.^{13,14}

Vários polimorfismos genéticos do IRF6 têm sido associados ao risco de FONS em muitas populações, inclusive o subtipo fendas labiais e/ou palatinas não sindrômicas (FL/PNS). O SNP rs2235371, que altera a valina para a isoleucina na posição do aminoácido 274 (V274I), foi um dos primeiros polimorfismos significativamente associados ao FL/PNS em populações asiáticas e ameríndias.^{15,16} Entretanto, esse resultado não foi reproduzido em outros estudos.¹⁷⁻¹⁹ A variante rs642961, a qual está localizada dentro de um *enhancer* ~ 10 kb *upstream* do início da transcrição do IRF6, mostrou ser uma variante causativa em pessoas de ascendência europeia, foi responsável por 18% da ocorrência de fenda labial não sindrômica (FLNS).²⁰ O alelo A do rs642961 mostrou ser significativamente associado com FL/PNS em alguns estudos,^{21,22} mas esses resultados não foram reproduzidos em populações do Brasil, Irã ou Escandinávia.^{19,23} Outro GWAS sugeriu evidências de uma associação entre rs1044516 e FL/PNS em populações asiáticas, mas não em outras populações.¹¹ Esse mesmo polimorfismo também mostrou evidências de uma interação com o tabagismo materno em trios de pais e casos chineses.²⁴

A associação entre as variantes do IRF6 e as FONS tem sido amplamente explorada em várias populações, em um esforço para determinar se a triagem da mutação do IRF6 deveria se tornar um procedimento de rotina, dado seu papel crucial nas FO. No entanto, em populações geneticamente heterogêneas, como as brasileiras, a associação entre FONS e variantes comuns do IRF6 não foi confirmada e variantes não reconhecidas do IRF6 foram pouco investigadas. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a associação dos polimorfismos do IRF6 (rs2235371, rs642961, rs2236907, rs861019 e rs1044516) com o desenvolvimento de FONS em uma população do nordeste do Brasil. Além disso, avaliamos o efeito potencial de combinações alélicas dos polimorfismos do IRF6 no desenvolvimento de FONS.

Método

População

A população do estudo consistiu em 186 pacientes com FONS e 182 indivíduos-controle. Pacientes com FONS entre 1 e 25 anos de ambos os sexos foram recrutados na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e do Hospital Pediátrico Varela Santiago, ambos em Natal, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. O

grupo controle consistiu em crianças com mais de 5 anos sem histórico familiar de fissuras, recrutadas em escolas públicas de Natal, no Rio Grande do Norte, Brasil. Os pacientes com FONS foram classificados como fenda labial e palatina (FLP), apenas fenda palatina (FP) ou apenas fenda labial (FL), de acordo com o esquema de Fogh-Andersen.⁹ Um geneticista avaliou os pacientes e excluiu aqueles com características de qualquer síndrome associada.

O comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte aprovou o estudo sob o número 787.389. O estudo foi feito de acordo com a Declaração de Helsinque e a resolução nº 66/12 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil. Consentimento informado por escrito foi obtido de todos os indivíduos adultos e pais ou responsáveis legais de participantes menores de idade.

Análise genética

O DNA genômico foi isolado de leucócitos de sangue periférico com um minikit QIAamp DNA Blood (Qiagen, Valencia, CA, EUA). A genotipagem foi feita por discriminação alélica com tecnologia TaqMan® com o sistema 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os ensaios pré-projetados, C_15952140_10, C_2238941_10, C_11672849_20, e C_2500178_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foram usados para genotipar os polimorfismos rs2235371, rs642961, rs2236907 e rs861019 do IRF6, respectivamente. Para o polimorfismo rs1044516, *primers* e sondas foram projetados com o *software* Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os *primers* foram sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA) e as sondas por Applied Biosystems. Os *primers* e sondas para este ensaio são os seguintes: *forward*, 5'-GAGGAATGGATGAGTGATTTGTGA3'; *reverse*, 5'-ATGTACTCTCCCGGCATTCTGA3'; sonda 1, 5'-FAM-TCTTAAGTAGATACCCCGTT-MGB-3' e sonda 2, 5'-VIC-TAGATAACCCCGTTTC-MGB-3'. Para validar o método de genotipagem, 10% das amostras foram escolhidas aleatoriamente para regenotipagem.

Os polimorfismos genotipados neste estudo foram escolhidos com base nos seguintes critérios: associações relatadas anteriormente com FO, localização dentro de regiões reguladoras, codificadoras ou putativas e interações conhecidas com fatores ambientais. TagSNPs foram usados para identificar a variação haplotípica comum dentro do IRF6. O rs2235371 está localizado no exon 7, o rs642961 está localizado dentro de um *enhancer*, o rs2236907 está em uma região intrônica, o rs861019 está dentro do 5'-UTR e o rs1044516 está dentro do 3'-UTR.

Análises estatísticas

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado através do teste do qui-quadrado. Associações entre polimorfismos e grupos fenotípicos foram avaliadas pelo cálculo do *odds ratio* (OR) e seu IC 95% associado com o pacote SNPAssoc do *software* estatístico R, versão 2.15.2 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria). O desequilíbrio de ligação (LD) entre pares foi calculado como D' para todos os SNPs com o programa Haploview (versão 4.2; Broad Institute, Cambridge, MA, EUA). A estrutura de blocos de haplótipos foi determinada com o algoritmo de intervalo de confiança²⁵ e as frequências haplotípicas foram estimadas com o algo-

Tabela 1 Características clínicas dos grupos estudados

	Caso (n = 186)	Controle (n = 182)	p-valor
Sexo^a			
Masculino	119 (64,1%)	90 (49,4%)	< 0,001
Feminino	67 (35,9%)	92 (50,6%)	
Idade^b	8,1 ± 7,5	11,7 ± 6,2	0,175
Tipos de fendas			
Fenda labiopalatina (FLP)	106 (57,0%)		
Masculino	84 (79,2%)		
Feminino	22 (20,7%)		
Fenda labial isolada (FL)	42 (22,6%)		
Masculino	28 (66,6%)		
Feminino	14 (33,3%)		
Fenda palatina isolada (FP)	38 (20,4%)		
Masculino	06 (15,7%)		
Feminino	32 (84,2%)		

^a Teste de qui-quadrado.

^b teste t.

ritmo de maximização da expectativa. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

A [tabela 1](#) mostra as características clínicas dos grupos de estudo e controle. Entre os 186 pacientes com FONS, houve predominância do sexo masculino, especialmente com os tipos FL e FLP e maior número de indivíduos do sexo feminino no tipo FP, o que está de acordo com estudos anteriores. Não houve diferenças na distribuição etária entre os grupos de estudo e controle. FLP foi o tipo de fenda mais relatado, seguida por FP e FL. Aproximadamente um terço dos pacientes apresentava histórico familiar de fendas. Todos os polimorfismos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. As distribuições alélicas e genotípicas dos polimorfismos do IRF6 (rs2235371, rs642961, rs2236907, rs861019, e rs1044516) em casos do estudo e controles são apresentadas na [tabela 2](#). Levando em consideração as diferenças embriológicas de FONS, as frequências dos polimorfismos do IRF6 no grupo de estudo foram analisadas nos subgrupos FL/P (FL + FLP) e FP. Houve uma associação significativa entre rs2235371 e FP, o alelo T ($p = 0,004$) e o genótipo TT ($p = 0,016$) foram mais frequentes no grupo FP do que no grupo controle.

Nenhum dos polimorfismos estudados mostrou diferenças nas frequências alélicas ou genotípicas entre o grupo de casos total e os controles (dados não mostrados). A análise de LD dos polimorfismos do IRF6 é mostrada na [figura 1](#). Um bloco de haplótipos foi construído entre rs861019 e rs642961; no entanto, ele não mostrou associação significativa FONS ($p > 0,05$).

Discussão

As FONS têm sido estudadas por muitos anos, na tentativa de entender sua etiologia, uma vez que constituem a maioria dos casos de FO. Os fatores genéticos são conhecidos por desempenhar um papel importante no desenvolvimento de FO, dado o aumento do risco de ocorrência em

parentes até o terceiro grau, quando comparado com a população em geral.²⁶ Em estudos anteriores, variações no IRF6 foram responsáveis por uma porcentagem considerável da contribuição genética para FONS. As variantes do IRF6 também foram associadas com os subfenótipos mais graves e variações de forma simétricas nesses pacientes, inclusive uma testa com maior protrusão, um nariz mais curto e plano mandibular mais inclinado.^{10,22,27-30} Entretanto, estudos que investigaram os polimorfismos do IRF6 em diferentes populações de pacientes apresentaram resultados divergentes.^{17,31} Esses achados são especialmente discordantes em estudos com populações miscigenadas, como as do Brasil, cujos resultados variaram de acordo com a região geográfica e etnia estudada.^{16,19,32} Assim, a fim de melhor compreender a associação do IRF6 com o FONS, avaliamos os polimorfismos rs2235371, rs642961, rs2236907, rs861019 e rs1044516 em uma população brasileira.

Nenhum dos alelos ou genótipos nos polimorfismos do IRF6 aqui avaliados foi associado a um risco aumentado de FONS na população estudada. Embora tenha sido encontrada uma associação entre rs2235371 e o grupo FP, esse resultado deve ser interpretado com cautela, uma vez que o pequeno número de indivíduos desse grupo afetou a confiabilidade do resultado e a associação perdeu significância após a correção para múltiplos testes. Um resultado similar para rs2235371 em pacientes com FP foi relatado em uma população indiana.³³

Vários estudos relataram associações entre o risco de rs2235371 e FONS, especialmente em populações asiáticas. Um estudo de GWAS feito por Sun et al.¹⁵ mostrou que a variante rs2235371 estava consistentemente associada com FL/PNS e parecia ter uma importância maior do que a variante causal previamente identificada, rs642961, em populações chinesas.¹⁵ O alelo A e os genótipos AA e AG em rs2235371 foram associados com um risco diminuído de FL/PNS nessa população quando comparados aos genótipos GG. Entretanto, em brancos, esses genótipos não estão significativamente associados às FONS.³¹ A baixa frequência do alelo que codifica a isoleucina em populações de descendência europeia é uma possível explicação para esses resultados divergentes entre as populações.²⁰ De fato,

Tabela 2 Frequências genotípicas dos polimorfismos do IRF6 nos grupos estudados

Polimorfismos	Genótipos	Controle	FLP + FL (%)	OR (95% CI)	p-valor	FP (%)	OR (95% CI)	p-valor
rs2235371	CC	163 (89,6%)	129 (87,1%)	1,00	0,247	29 (76,3%)	1,00	0,016 ^a
	CT	17 (9,3%)	16 (10,8%)	1,61 (0,84-3,10)		05 (13,2%)	1,65 (0,57-4,83)	
	TT	02 (1,1%)	03 (2,0%)	2,19 (0,39-12,12)		04 (10,5%)	11,24 (1,97-64,22)	
	Portador de alelo menor (CT + TT)	19 (10,4%)	19 (12,8%)	1,22 (0,54-1,72)		2,35 (0,23-3,71)	0,033 ^a	
	Frequência de alelo menor	21 (5,75%)	22 (7,4%)	1,16 (0,69-1,55)		3,01 (0,97-8,97)	0,004 ^a	
rs642961	GG	133 (73,5%)	112 (74,3%)	1,00	0,754	30 (76,9%)	1,00	0,590
	GA	43 (23,8%)	29 (19,5%)	0,84 (0,51-1,39)		07 (17,9%)	0,72 (0,30-1,76)	
	AA	05 (2,8%)	06 (6,2%)	1,17 (0,35-3,94)		02 (5,1%)	1,77 (0,33-9,58)	
	Portador de alelo menor (GA + AA)	48 (26,6%)	35 (25,7%)	1,56 (0,98-5,67)		2,34 (0,96-5,98)	0,672	
	Frequência de alelo menor	53 (14,7%)	42 (15,9%)	1,89 (0,34-3,27)		3,57 (0,64-4,57)	0,748	
rs2236907	CC	93 (51,3%)	65 (43,6%)	1,00	0,216	20 (51,3%)	1,00	0,384
	CA	57 (31,7%)	51 (34,8%)	0,80 (0,50-1,26)		10 (25,6%)	1,24 (0,54-2,84)	
	AA	28 (15,5%)	32 (21,6%)	1,31 (0,71-2,42)		09 (23,1%)	2,04 (0,74-5,62)	
	Portador de alelo menor (CA + AA)	85 (47,2%)	83 (56,4%)	2,01 (1,17-3,12)		3,25 (0,12-12,89)	0,872	
	Frequência de alelo menor	113 (31,3%)	115 (39,0%)	1,69 (0,82-2,89)		2,12 (0,45-5,12)	0,723	
rs861019	AA	85 (46,1%)	72 (48,9%)	1,00	0,827	20 (52,6%)	1,00	0,396
	AG	64 (35,0%)	50 (34,2%)	1,08 (0,69-1,72)		15 (39,4%)	1,01 (0,48-2,13)	
	GG	33 (18,9%)	26 (16,9%)	0,91 (0,50-1,66)		03 (7,8%)	0,49 (0,15-1,61)	
	Portador de alelo menor (CA + AA)	97 (53,9%)	76 (51,1%)	1,98 (1,21-2,93)		2,78 (1,12-3,27)	0,827	
	Frequência de alelo menor	130 (36,4%)	106 (34,0%)	1,23 (0,67-3,56)		3,89 (0,45-6,34)	0,645	
rs1044516	AA	99 (55,0%)	88 (59,4%)	1,00	0,645	20 (51,3%)	1,00	0,893
	AC	71 (39,4%)	52 (35,1%)	0,82 (0,53-1,26)		17 (43,6%)	1,19 (0,58-2,42)	
	CC	10 (5,6%)	08 (5,4%)	0,84 (0,33-2,15)		02 (5,1%)	0,99 (0,20-4,87)	
	Portador de alelo menor (AG + GG)	81 (45,0%)	60 (40,5%)	2,10 (1,02-3,65)		1,87 (1,65-3,01)	0,574	
	Frequência de alelo menor	91 (25,3%)	68 (22,9%)	3,21 (0,75-4,96)		3,15 (0,89-4,56)	0,897	

^a Associação significativa, $p < 0,05$.

FLP, fenda labiopalatina; FL, fenda labial isolada; FP, fenda palatina isolada.

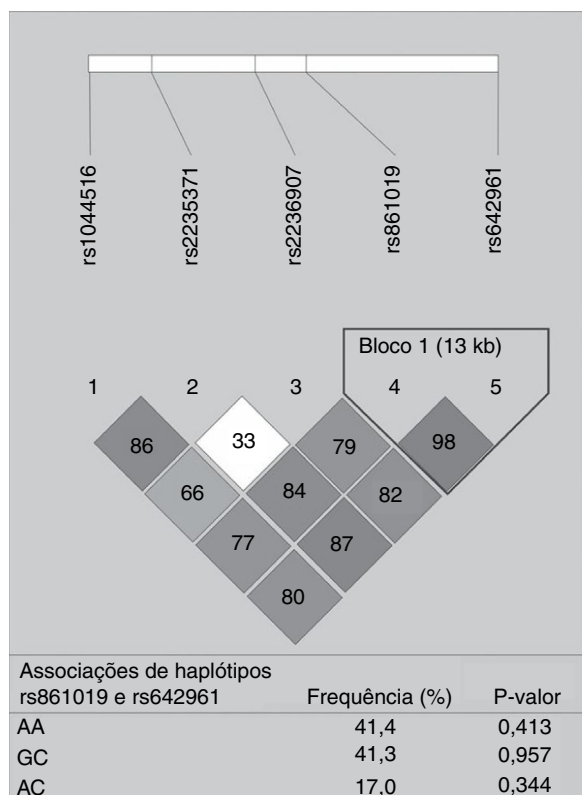


Figura 1 Gráfico de desequilíbrio de ligação entre pares de IRF6/rs1044516, rs2235371, rs2236907, rs861019 e rs642961 na amostra combinada (casos & controles) mostra os valores de r^2 ($\times 100$). O bloco é projetado de acordo com a coluna sólida de desequilíbrio de ligação (LD) desenvolvida internamente. O valor dentro de cada diamante representa a correlação paritária entre pares de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *single-nucleotide polymorphisms*) (medidos como $100 \times r^2$) definidos pelos lados superior esquerdo e superior direito do diamante. Abaixo são mostradas a frequência de cada haplótipo.

o rs2235371 parece não ser causal, mas sim estar em LD com outra variante causal no IRF6.²⁷

Entre os estudos feitos em populações brasileiras, Letra et al.³² investigaram 142 trios pais-casos de São Paulo e encontraram uma associação positiva entre o polimorfismo rs2235371 e os subfenótipos específicos, casos de FLP e FP completos com impactação de dentes permanentes. Embora o IRF6 não tenha sido um forte fator de risco nesse estudo, os autores sugeriram que as variantes do IRF6 contribuíram para o subfenótipo específico, ao controlar o lado do desenvolvimento de fenda unilateral.

De Souza et al.¹⁶ estudaram 673 indivíduos do sul, sudeste e nordeste do Brasil e observaram uma associação significativa entre o alelo G em rs2235371 e FL/P e FL, mas não FP em indivíduos com ascendência europeia. Em contraste, Paranaíba et al.¹⁹ estudaram 228 pacientes de Minas Gerais, Brasil e não observaram associação entre rs2235371 e FONS.

O SNP rs642961 mostrou estar associado com FL/PNS em populações europeias e asiáticas.^{21,31} O alelo A e os genótipos AA e GA em rs642961 mostraram-se significativamente associados a FL/PNS, especialmente em indivíduos com FL.^{20,31} Do Rego-Borges et al.³⁴ estudaram 293 paci-

entes não aparentados com FL/PNS de uma população brasileira com alto nível de ancestralidade africana (estado da Bahia) e encontraram uma associação marginal com heterozigotos rs642961 (GA), o que eles atribuíram ao componente significativo de ancestralidade europeia nessa população.

Entretanto, como no presente estudo, muitas investigações não conseguiram reproduzir essa associação com rs642961. No presente estudo, a falta de associação pode ser atribuída ao menor tamanho da amostra e ao efeito da heterogeneidade clínica entre os indivíduos afetados (por exemplo, variação na gravidade da doença).²² De fato, alguns estudos encontraram apenas uma associação com esse SNP ao analisar subtipos específicos de fendas ou ao analisar combinações haplotípicas com outros polimorfismos. Sun et al.¹⁵ demonstraram que o efeito de rs642961 pode ser enfraquecido por rs2235371, sugeriram que as variantes principais podem estar localizadas no rs2235371 em haplótipos relacionados.

Brito et al.³⁵ estudaram 563 pacientes com FL/PNS de cinco cidades brasileiras e não encontraram associação significativa de alelos com rs642961. No entanto, quando estratificados por subfenótipos, foi encontrada uma associação entre rs642961 e FL. De Souza et al.¹⁶ não relataram uma associação quando rs642961 foi analisado individualmente, mas análises de haplótipos mostraram uma associação do alelo A de rs642961 e do alelo G de rs2235371 com um risco aumentado de FL/PNS em crianças e suas mães.

Embora se saiba que a informação do haplótipo pode aumentar a resolução dos dados genéticos em comparação com o exame dos SNPs individualmente, nosso estudo não mostrou associação significativa com o haplótipo construído e o risco de FONS.

Conclusão

Embora as contribuições de genes únicos, como o IRF6, pareçam agora explicar aproximadamente 15% dos casos de FONS, no presente estudo de caso-controle não houve associações significantes entre os SNPs rs2235371, rs642961, rs2236907, rs861019 ou rs1044516 no IRF6 e FONS. Apesar de ter encontrado uma associação entre rs2235371 e risco de FP em nossos pacientes, estudos adicionais em populações similares, mas com amostras maiores, são necessários para investigar associações potenciais com diferentes subfenótipos de FONS e identificar o padrão de variantes genéticas do IRF6 em populações miscigenadas, como as encontradas no Brasil.

Financiamento

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, sob o número 477608/2011-6.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Wehby G, Cassell CH. The impact of orofacial clefts on quality of life and health care use and costs george. *Oral Dis*. 2011;16:3–10.
- Massenburg BB, Jenny HE, Saluja S, Meara JG, Shrimel MG, Alonso N. Barriers to cleft lip and palate repair around the world. *J Craniofac Surg*. 2016;27:1741–5.
- Mai CT, Cassell CH, Meyer RE, Isenburg J, Canfield MA, Rickard R, et al. Birth defects data from population-based birth defects surveillance programs in the United States, 2007 to 2011: Highlighting orofacial clefts. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol*. 2014;100:895–904.
- Watkins SE, Meyer RE, Strauss RP, Aylsworth AS. Classification, epidemiology, and genetics of orofacial clefts. *Clin Plast Surg*. 2014;41:149–63.
- Khandelwal KD, van Bokhoven H, Roscioli T, Carels CEL, Zhou H. Genomic approaches for studying craniofacial disorders. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*. 2013;163:218–31.
- Fraser F. Thoughts on the etiology of clefts of the palate and lip. *Acta Genet Stat Med*. 1955;5:358–69.
- Marazita ML, Mooney MP. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. *Clin Plast Surg*. 2004;31:125–40.
- Sivertsen A, Wilcox AJ, Skjaerven R, Vindenes HA, Abyholm F, Harville E, et al. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ*. 2008;336:432–4.
- Fogh-Andersen P. Inheritance of harelip and cleft palate: contribution to the elucidation of the etiology of the congenital clefts of the face [dissertation]. Copenhagen:Busk;. 1942.
- Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, 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. *N Engl J Med*. 2004;351:769–80.
- Leslie EJ, Carlson JC, Shaffer JR, Feingold E, Wehby G, Laurie CA, et al. A multi-ethnic genome-wide association study identifies novel loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on 2p24.2, 17q23 and 19q13. *Hum Mol Genet*. 2016;25:2862–72.
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Daack-hirsch S, Sander A, et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet*. 2011;32:285–9.
- Richardson RJ, Dixon J, Malhotra S, Hardman MJ, Knowles L, Boot-handford RP, et al. Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nat Genet*. 2006;38:1329–34.
- Ingraham CR, Kinoshita A, Kondo S, Yang B, Sajan S, Trout KJ, et al. Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). *Nat Genet*. 2006;38:1335–40.
- Sun Y, Huang Y, Yin A, Pan Y, Wang Y, Wang C, et al. Genome-wide association study identifies a new susceptibility locus for cleft lip with or without a cleft palate. *Nat Commun*. 2015;6:6414.
- de Souza LT, Kowalski TW, Ferrari J, Monlléo IL, Ribeiro EM, de Souza J, et al. Study of IRF6 and 8q24 region in non-syndromic oral clefts in the Brazilian population. *Oral Dis*. 2016;22:241–5.
- Wang M, Pan Y, Zhang Z, Wang L. Three polymorphisms in IRF6 and 8q24 are associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence from 20 studies. *Am J Med Genet A*. 2012;158A:3080–6.
- Shi J, Song T, Jiao X, Qin C, Zhou J. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of the IRF6 and TFAP2A in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCLP) in a northern Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;410:732–6.
- Paranaíba LMR, 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*. 2010;16:193–7.
- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, et al. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet*. 2008;40:1341–7.
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, et al. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet*. 2009;41:473–7.
- Kerameddin S, Namipashaki A, Ebrahimi S, Ansari-Pour N. IRF6 Is a Marker of Severity in Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *J Dent Res*. 2015;94:226s–32s.
- Pegelov M, Koillinen H, Magnusson M, Fransson I, Unneberg P, Kere J, et al. Association and Mutation Analyses of the IRF6 Gene in Families With Nonsyndromic and Syndromic Cleft Lip and/or Cleft Palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2014;51:49–55.
- Wu T, Liang KY, Hetmanski JB, Ruczinski I, Fallin MD, Ingersoll RG, et al. Evidence of gene-environment interaction for the IRF6 gene and maternal multivitamin supplementation in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate. *Hum Genet*. 2010;128:401–10.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296:2225–9.
- Grosen D, Chevrier C, Skytthe A, Bille C, Molsted K, Sivertsen A, et al. A cohort study of recurrence patterns among more than 54 000 relatives of oral cleft cases in Denmark: support for the multifactorial threshold model of inheritance. *J Med Genet*. 2010;47:162–8.
- Park JW, McIntosh I, Hetmanski JB, Jabs EW, Vander Kolk CA, Wu-Chou Y-H, et al. Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. *Genet Med*. 2007;9:219–27.
- Beatty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet*. 2010;42:525–9.
- Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, Goldstein McHenry T, et al. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered*. 2009;68:151–70.
- Miller SF, Weinberg SM, Nidey NL, Defay DK, Marazita ML, Wehby GL, et al. Exploratory genotype-phenotype correlations of facial form and asymmetry in unaffected relatives of children with non-syndromic cleft lip and/or palate. *J Anat*. 2014;224:688–709.
- Wattanawong K, Rattanasiri S, McEvoy M, Attia J, Thakkinsatian A. Association between IRF6 and 8q24 polymorphisms and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: Systematic review and meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2016;106:773–88.
- Letra A, Fakhouri W, Fonseca RF, Menezes R, Kempa I, Prasad JL, et al. Interaction between IRF6 and TGFA genes contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *PLoS One*. 2012;7:e45441.
- Gurramkonda VB, Syed AH, Murthy J, Lakkakula BVKS. IRF6 rs2235375 single nucleotide polymorphism is associated with isolated non-syndromic cleft palate but not with cleft lip with or without palate in south Indian population. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2018;84:473–7.
- do Rego Borges A, Sá J, Hoshi R, Viena CS, Mariano LC, de Castro Veiga P, et al. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Brazilian population with high African ancestry. *Am J Med Genet A*. 2015;167:2344–9.
- Brito LA, Bassi CFS, Masotti C, Malcher C, Rocha KM, Schlesinger D, et al. IRF6 is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population. *Am J Med Genet A*. 2012;158A:2170–5.