



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

miRNAs no Mecanismo das Fissuras Orais Não-Sindrômicas

SISSY MARIA DOS ANJOS MENDES

BELÉM
NOVEMBRO/2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

SISSY MARIA DOS ANJOS MENDES

miRNAs no Mecanismo das Fissuras Orais Não-Sindrômicas

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos

BELEM
NOVEMBRO/2021

I

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS

1. Instituições Participantes

- i. Universidade Federal do Pará (UFPA):
 - a. Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.
- ii. Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará – Diretoria de Ensino e Pesquisa, Gerência de Pesquisa
 - a. Centro de Referência em Fissuras e Anomalias Craniofaciais - CREFAC do Hospital Santa Casa do Pará, cidade Belém-PA

2. Fontes Financiadoras

- i. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
 - a. Rede de Pesquisa em Genômica Populacional Humana/RPGPH (Bio Comp/CAPES) – Custeio
- ii. Universidade Federal do Pará (UFPA)
 - a. Laboratório de Genética Humana e Médica – Custeio

II

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Santa Teresa de Calcutá)

III

Dedico aos meus amados pais Oscar (in memoriam) e Graça,
por todas as vezes que deixaram seus sonhos de lado, para dar asas aos meus.

Esta conquista é de vocês e para vocês!

IV

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a **Deus** por ser o doador e o mantenedor da minha vida; Agradeço inicialmente a “ELE”, por guiar meus passos, ouvir minhas preces, acalantar meu coração me dando forças para prosseguir e abençoar toda a minha trajetória. Gratidão, por ter colocado pessoas essenciais na minha vida para a conclusão deste sonho!

- Às fontes financiadoras, **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** através da **Rede de Pesquisa em Genômica Populacional Humana/RPGPH (BioComp/CAPES)** – Custeio e a **Universidade Federal do Pará (UFPA)** através do **Laboratório de Genética Humana e Médica**– Custeio

- Obrigada meus amados pais **Oscar (in memoriam) e Graça**, por todas as vezes que deixaram seus sonhos de lado, para dar asas aos meus.

- Em especial, Obrigada **Mãezinha Graça**, por suportar todos os meus surtos, te amo!

- Obrigada meus **Filhos Gabriel e Rafael**, por estarem comigo em todos os momentos, me apoiar e acreditar em mim até mesmo quando eu desacreditei... Me ensinando um caminho especial, onde podemos ver que Deus é bom o tempo todo! Amo vocês!

- Gratidão ao **meu clone biológico Suelly**, minha alma gêmea, por todos os incêndios apagados, por todos os cafés, todos os “no final sempre dá certo”. Eu não encontro palavras para te agradecer, obrigada por tudo.... tudo! **Renan e Raissa** junto com sua Mãe, vocês fazem parte deste sonho!

- Meu **Irmão querido Sidney**, obrigado por me permitir conviver com esse bom coração e sua família linda **Paula, Gisa e Guilherme** que me dão muito Amor!

- Minha **Família dos Anjos**, tias e primos! Em especial a minha **Tia Mãe Maria Luiza**, que não medem esforços para somar na minha vida!!

- Agradeço **minha orientadora Ândrea**, profa. que me acolheu sem me conhecer, por toda a paciência e pelo aprendizado, acadêmico e para a vida...Sem palavras que definem esta pessoa, mas a certeza que é um Anjo que fez meu caminho muito mais trilhável e cheio de verdades!

- Obrigada **Diego Marques!** Certamente sem você estas páginas não existiriam, jamais conseguirei agradecer sua dedicação, gentileza, disponibilidade e paciência. O mundo seria melhor se houvessem mais Diegos!

- Obrigada **colegas do Laboratório de Genética Médica e Humana LGHM, da UFPA,** por deixarem o fardo mais leve, muitas vezes segurando minha mão, ensinando a genética com paixão, em especial a Miguel, Paola, Mayara, Giovana, Ana Paula, Jhon, Leandro e Amanda, tenham certeza que foram imprescindíveis nesta conquista!

- Agradeço ao **Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA,** todos os professores e funcionários, foram muitos anos de convivência e aprendizado. Gratidão real aos **“Profs” e direção do PPGBM** junto com o LGHM, pelas portas e braços abertos do primeiro ao último dia com tudo o que foi necessário para finalizar deste Doutorado.

- Minha **Comunidade Católica Cristo Alegria** que foi suporte de muitas quedas e que é instrumento de Deus para minha vida!

- Agradecer especialmente ao **amigo irmão do Prof. Dr. David Normando,** quem apoiou este sonho do início ao fim.

- Agradeço ainda à **UFPA e Santa Casa,** em especial ao **Centro de Deformidade Faciais,** instituições fiéis ao melhoramento do mundo.

- E ao final, mas não menos importante, a todos os **pacientes participantes do estudo,** os quais depositaram total confiança neste trabalho, que seus passos sejam abençoados imensamente, e que as pesquisas futuras venham lhes beneficiar com a empatia necessária para que o mundo seja melhor! Objetivo principal deste meu sonho, como Ortodontista que trata as consequências, encontrar algo que possa ser meio de evitar as fissuras lábio palatinas, que são um fardo pesado para quem as possui! **#THANKSGOD**

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µG	Micrograma
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Kg	Quilograma
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
Pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
U	Unidade
FL	: fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais
FP	fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas
FLP	fissuras transforme incisivo ou fissuras lábio-palatinas
NS	Não sindrômica

VI

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Ilustração anatômica do palato. (a) Corte sagital do crânio. (b) Eixo transversal do palato duro. (c) Divisão anatômica do palato, no eixo transversal.

FONTE: <https://www.anatomiaemfoco.com.br/sistema-digestivo-anatomia/palato-duro-palato-mole-ceu-da-boca/> acessado 18/10/202118

Figura 2 – Desenvolvimento facial. Representação ilustrativa das fases do desenvolvimento embrionário; (a) Quarta semana, (b) quinta semana, (c) final da sexta semana, (d-f) da sexta semana a décima semana. Fonte: DIXON, 201119

Figura 3. Processos de crescimento, elevação e fusão da prateleira palatina. **I** – iniciação. **II** – crescimento vertical. **III** - elevação e crescimento horizontal. **IV** - adesão e fusão. **Mxp** – processo maxilar. **MdP** – processo mandibular. **NS** – septo nasal. **T** – tongue. Destacado em verde – prateleiras palatinas.....20

Figura 4 – Curso de tempo na formação do palato durante o desenvolvimento embrionário em camundongos. (a-e) Corado com hematoxilina e eosina no E12.5 (a), E13.5 (b), E14.5 (c), E15.5 (d) e E16.5 (e). (f-k) Imagens do microscópico eletrônico de varredura no E12.5 (f), E13.0 (g), E13.5 (h), E14.0 (i), E14.5 (j) e E15.0 (k).....20

Figura 5 – Classificação das fissuras orais segundo Spina (SPINA 19772). **A** – Fissura Labial Esquerda Pré-forame Incompleta. **B** – Fissura Labial Bilateral Pré-forame Incompleta. **C** – Fissura Labial Esquerda Pré-forame Completa. **D** – Fissura Labial Bilateral Pré-forame Completa. **E** – Fissura Labial Esquerda Transforame Completa. **F** – Fissura Labial Transforame Completa. **G** – Fissura Palatina Pós-forame Completa. **H** – Fissura Palatina Pós-forame Incompleta.21

Figura 6 – Classificação dos principais RNAs não codificantes estruturais e regulatórios. Em destaque os mais investigados.....25

Figura 7 – Resumo ilustrativo representando a síntese e função dos microRNAs. **(A)** Esquema demonstrando a biogênese nos microRNA. **(B)** Esta figura mostra uma visão global da função do microRNA durante o processo de regulação pós-transcricional, de acordo com o perfil de expressão. **(C)** Representação da comunicação materno-fetal através do microRNA, ocorrendo atrás do contato direto entre as células ou por transferência, mediada por fluidos corporais26

Figura 8 – Quantidade de artigos publicados que abordam o tema “Fissuras Orais” e “microRNA”, de acordo com o PubMed. Parâmetro de busca: ("Cleft Lip"[Mesh] OR "Cleft

Palate"[Mesh] OR "Oral Cleft"[Mesh]) AND ("MicroRNAs"[Mesh] OR "Circulating MicroRNA"[Mesh]). Data da busca: 01 de setembro de 2021.....27

Figura 9 –Descrição dos grupos e detalhamento da quantidade e origem das amostras.....28

Figura 10 – Gráfico comparativo entre o padrão de ancestralidade genômica relativa dos grupos caso e controle.....30

Figura 11 – Lista de miRNAs upregulated de acordo com o tipo de fissura oral. O valor numérico indica quantos estudos associaram o correspondente miRNA com o tipo de malformação oral. O diagrama de Venn indica a quantidade de miRNAs que cada tipo de fissura compartilha em comum. CLP – Fissura labiopalatina. CL – Fissura labial. CP – Fissura palatina.35

Figura 12 – Lista de miRNAs downregulated de acordo com o tipo de fissura oral. O valor numérico indica quantos estudos associaram o correspondente miRNA com o tipo de malformação oral. O diagrama de Venn indica a quantidade de miRNAs que cada tipo de fissura compartilha em comum. CLP – Fissura labiopalatina. CL – Fissura labial. CP – Fissura palatina.39

Figura 13 – Análise de enriquecimento dos genes alvo dos miRNAs.....40

Figura 14 - Rede dos miRNAs diferencialmente expressos dos FLP e seus genes alvos. A intensidade das cores aponta para a quantidade de ligações. O traço indica se a ligação é forte ou fraca.....42

Figura 15 – Esquema ilustrativo do papel dos miRNA identificados na palatogênese.....43

Figura 16 – Análise de enriquecimento dos genes alvo dos miRNAs.....44

Figura 17 - Rede dos miRNAs diferencialmente expressos dos FLP e seus genes alvos. A intensidade das cores aponta para a quantidade de ligações. O traço indica se a ligação é forte ou fraca.....45

Figura 18 – Esquema ilustrativo do papel dos miRNA identificados na palatogênese.....47

Tabela 1. Fatores de risco associados as fissuras orais.....	22
Tabela 2. Características demográficas dos participantes.....	30

RESUMO

A literatura recente aponta os microRNAs (miRNAs) como um dos principais reguladores da expressão gênica, que atuam em várias fases de processos essenciais para o desenvolvimento embrionário, inclusive do correto fechamento da cavidade oral. No palato, o aumento da expressão de miRNAs nas células mesenquimais do palato resulta no aumento da proliferação, por inibir a via de sinalização do TGF- β e modular a síntese do colágeno. Contudo, apesar do papel de alguns miRNAs no fechamento correto da linha média e por conseguinte da cavidade oral já terem sido estabelecidos em estudos *in vivo* e *in vitro*, com camundongos e culturas celulares, respectivamente, muito pouco se conhece sobre esses mecanismos em humanos. No presente trabalho, realizou-se a coleta do sangue periférico de crianças com idade entre 4 à 160 meses atendida no Hospital Santa Casa de Misericórdia do Pará (Belém, PA, Brasil) para seguir nas investigações por meio de técnicas de biologia molecular (extração de RNA, sequenciamento) e de bioinformática, dos miRNAs circulantes expressos no processo da Fissuras Lábio Palatais não sindrômicas. Foram observados 178 miRNAs expressos no grupo de crianças que apresentavam Fissuras Lábio Palatais em comparação com o grupo controle. Destes, **16 miRNAs foram diferencialmente expressos**. Nove miRNAs evidenciaram uma clara distinção de expressão entre os grupos controle e acometidos com fissura lábio palatina (*hsa-miR-181b-5p*, *hsa-miR-181a-3p*, *hsa-miR181a-2-3p*, *hsa-miR-660-5p*, *hsa-miR-126b-3p*, *hsa-miR-324-3p*, *hsa-miR-381-3p*, *hsa-miR-598-3p* e *hsa-miR-769-5p*), dentre estes, sugere-se que os *hsa-miR-769-5p*, *hsa-miR-181a-2-3p*, *hsa-miR-323-3p* e *hsa-miR-181b-5p* possam apresentaram papéis cruciais no modulamento destas vias, por regular mais de um gene, Ferramentas de bioinformática foram empregadas para explorar as funções potenciais dos miRNAs e de suas redes regulatórias e genes alvos. Os resultados mostraram quatro miRNAs diferencialmente expressos (*hsa-miR-769-5p*, *hsa-miR-181a-2-3p*, *hsa-miR-323-3p* e *hsa-miR-181b-5p*) que se apresentaram presentes na regulação das vias HI e apoptose, que são envolvidas diretamente no processo de palatogênese e adesão celular das prateleiras palatinas. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo de miRnoma em uma população miscigenada do Norte do Brasil, que analisou o conjunto total de miRNAs em pacientes de fissura lábio palatina, fornecendo uma nova perspectiva sobre a etiologia de Fissuras Orais Não Sindrômicas (FONS) e lançando as bases para pesquisas futuras sobre os mecanismos regulatórios de ncRNAs em FONS.

Palavras-chaves: Fissuras orais não sindrômicas; miRNAs; ncRNA; apoptose; palatogênese; redes regulatórias; Brasil.

ABSTRACT

Recent literature points to microRNAs (miRNAs) as one of the main regulators of gene expression, which act in various stages of essential processes for embryonic development, including the correct closing of the oral cavity. In the palate, the increased expression of miRNAs in the mesenchymal cells of the palate results in increased proliferation, by inhibiting the TGF- β signaling pathway and affecting collagen synthesis. However, despite the role of some miRNAs in the correct closure of the midline and therefore of the oral cavity have already been established in *in vivo* and *in vitro* studies, with mice and cell cultures, respectively, very little is known about these mechanisms in humans. In the present work, the collection of peripheral blood from children aged between 4 and 160 months attended at the Hospital Santa Casa de Misericórdia do Pará (Belém, PA, Brazil) was carried out to continue the investigations using molecular biology techniques (extraction of RNA, sequencing) and of bioinformatics, of the circulating miRNAs expressed in the process of non-syndromic cleft lip and palate. A total of 178 miRNAs were differentially expressed in the group of children who had cleft lip and palate compared to the control group. It identified 16 differentially expressed miRNAs. Of these, nine miRNAs showed a clear expression distinction between control and cleft lip and palate groups (hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR181a-2-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-126b-3p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-381-3p, hsa-miR-598-3p and hsa-miR-769-5p). Of the nine (9) differentially expressed miRNAs, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-181a-2-3p, hsa-miR-323-3p and hsa-miR-181b-5p were shown to play crucial roles in their regulation. pathways, by regulating more than one gene, Bioinformatics tools have been employed to explore the potential functions of miRNAs and their regulatory networks and target genes. The results showed four differentially expressed miRNAs (hsa-miR-769-5p, hsa-miR-181a-2-3p, hsa-miR-323-3p and hsa-miR-181b-5p) that were present in the regulation of pathways HI and apoptosis, which are directly involved in the process of palatogenesis and cell adhesion to palatine shelves. As far as we know, this is the first study of miRnoma in a mixed population from Northern Brazil, which analyzed the total set of miRNAs in cleft lip and palate patients, providing a new perspective on the etiology of Nonsyndromic Oral Clefts (FONS) and laying the foundation for future research on the regulatory mechanisms of ncRNAs in FONS.

Keywords: Non-syndromic oral clefts; miRNAs; ncRNA; apoptosis; palatogenesis; regulatory networks; Brazil.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	33
OBJETIVO GERAL	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
MATERIAIS E METODOLOGIA	34
APROVAÇÕES DOS COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA	34
PACIENTES	34
COLETA DAS AMOSTRAS	35
ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR	35
<i>Extração de RNA total</i>	35
<i>Small RNA-Seq e preparação das bibliotecas (miRnoma)</i>	36
<i>Análise dos dados de RNA-Seq</i>	36
<i>Análise Funcional</i>	37
CARACTERIZAÇÃO DA ANCESTRALIDADE GENÔMICA	37
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	72
TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA ANÁLISE DE DADOS	73
TERMO DE ESCLARECIMENTO SERVIDOR SANTA CASA E AUTORIZAÇÃO PARA EFETUAR COLETA DE AMOSTRA	74
PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA DE AMOSTRAS CONSERVADAS EM TRIZOL	75

TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTIUCIONAL PARA COLETA DE DADOS..... 76

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AMOSTRA DE SANGUE

.....77

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Erro! Indicador não

definido.

INTRODUÇÃO

ASPECTO GERAL

As fissuras orais representam mundialmente as malformações congênitas mais frequentes da região craniofacial (MOSSEY 2012), representando aproximadamente 65% dos casos (RIOS MOURA 2019) com uma prevalência de 0,19 a 2,69 para cada 1.000 neonatos (LOFREDO, 2001), variando de acordo com o tipo de fissura e grupo étnico (VIEIRA, 2021). Ademais, quando comparado com a população geral, crianças com fissuras orais possuem nove (9) vezes mais chance de evoluir a óbito no primeiro ano de vida (CARLSON, 2013).

Este grupo de malformações impactam diretamente na qualidade de vida, afetando: a dentição; a estética; a fala; a audição; e as funções orais (PALANDI, 2011). Entre as primeiras complicações está a dificuldade no aleitamento materno, resultando em dificuldades no ganho de peso e no desenvolvimento da criança. Além disso, diversos estudos vêm mostrando evidências de que os indivíduos com fenótipo de fissuras orais possuem alterações na estrutura cerebral (NOPOLUS, 2007; VAN DER PLAS, 201; NOPULUS, 2002; WEINBERG, 2013), sugerindo uma provável relação entre as duas estruturas durante o desenvolvimento embrionário e o fechamento da linha média.

Mecanismos da junção normal da linha epitelial da linha média são revisados juntamente com processos patológicos que previnem essa malformação, ocasionando a fenda palatina. Malformações na fusão do palato secundário levarão à fenda palatina, um defeito congênito comum em humanos. A fusão do palato envolve a formação e degeneração subsequente da borda epitelial da borda medial. Os mecanismos celulares subjacentes à degeneração da costura têm sido um foco importante no estudo da palatogênese. Três

mecanismos têm sido propostos para a degeneração das costuras: migração lateral das células epiteliais da borda medial; trans-diferenciação epitelial-mesenquimal; e apoptose de células epiteliais da borda medial. No entanto, ainda há muita controvérsia sobre esses mecanismos propostos (MENG 2009). Um dos mecanismos mais relevante dentro deste processo é a apoptose, caracterizada pela diminuição no volume celular e consequente perda da aderência com a matriz extracelular. As organelas celulares envolvidas neste processo mantêm a sua morfologia, com exceção das mitocôndrias, que podem apresentar poros na sua membrana externa (ZIEGLER 2004).

As malformações orais são de origens multifatoriais, envolvendo fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (SEELAN, 2012; VIEIRA, 2012; LEAL 2020; ARAUJO 2016). Contudo, embora tenha sido estabelecido alguns fatores que possam estar relacionados com o desenvolvimento deste tipo de malformação – por exemplo: os nutricionais; os químicos; os endócrinos; os infecciosos e alguns conjuntos de genes relacionados com o desenvolvimento esquelético, da mesoderme, da ectoderme e neurológico –, a etiologia da fissura oral não-sindrômica permanece incerta (DIXON, 2011).

ANATOMIA

O palato humano é composto pelo palato duro e mole (Figura 1). O palato duro é a subseção óssea do palato da boca, constituindo cerca de dois terços do mesmo e separa as cavidades oral e nasal; limitando a cavidade oral superiormente e formando o teto da boca e o assoalho da cavidade nasal inferior. O palato mole é a extensão muscular posterior do palato duro e é composto por estruturas musculares, constituindo cerca de um terço da parte posterior do palato, que conjuntamente agem auxiliando na fala e na pronúncia de consoantes; previnem

a entrada de alimentos e líquidos na cavidade nasal durante a deglutição; e participam do reflexo do vômito.

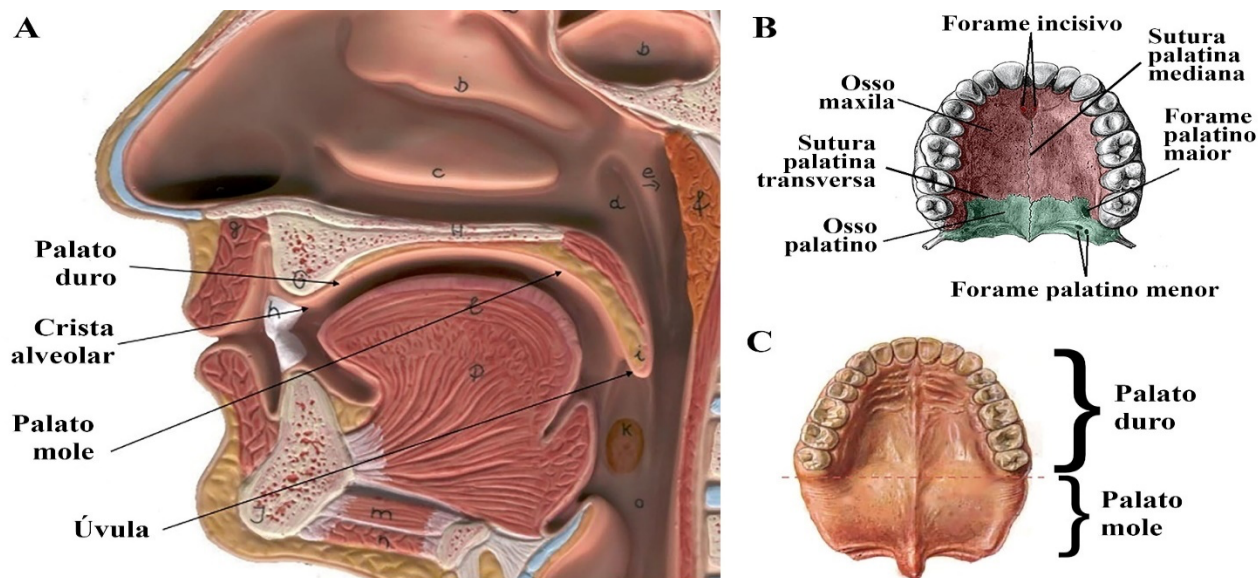


Figura 1 – Ilustração anatômica do palato. (a) Corte sagital do crânio. (b) Eixo transversal do palato duro. (c) Divisão anatômica do palato, no eixo transversal. FONTE: <https://www.anatomiaemfoco.com.br/sistema-digestivo-anatomia/palato-duro-palato-mole-ceu-da-boca/> acessado 18/10/2021

PALATOGÊNESE

O desenvolvimento palatal acontece entre a quinta e a décima-segunda semana pós-concepção (MERRITT, 2005), Figura 2. Durante a quinta semana, dois rebordos de crescimento que circundam a placóide nasal aparecem, os processos nasais lateral e medial, devido a invaginação do epitélio dos placóides e a proliferação da mesoderme subjacente; formando duas fossetas olfatórias (MARTINELLI,2020).

Nas duas semanas seguintes, os processos maxilares aumentam de volume e se aproximam dos processos nasolateral e nasomediano, formando o sulco nasolacrimal; em que aos poucos os processos maxilares comprimem os nasomedianos até se fundirem e formarem

o lábio superior e o palato primário (MARTINELLI, 2020). As asas do nariz provêm dos processos nasais laterais. Os dois processos nasomedianos unidos com o processo frontal formam o processo frontonasal.

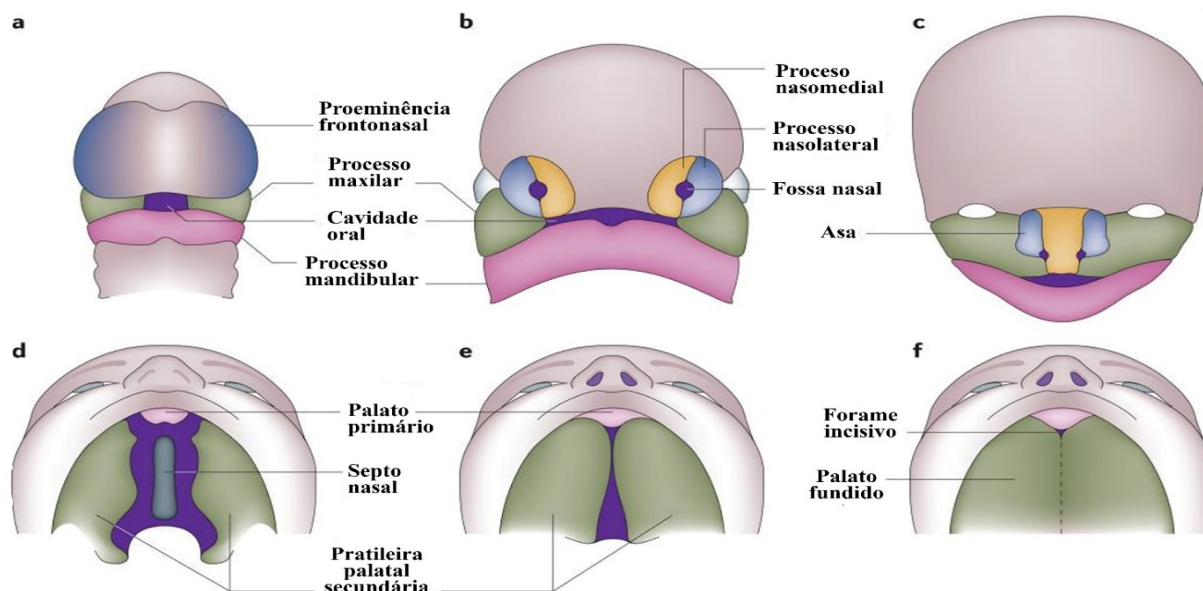


Figura 2 – Desenvolvimento facial. Representação ilustrativa das fases do desenvolvimento embrionário; (a) Quarta semana, (b) quinta semana, (c) final da sexta semana, (d-f) da sexta semana a décima semana. Fonte: DIXON, 2011

O palato definitivo se forma a partir de um prolongamento (cristas palatinas) procedente dos processos maxilares em direção quase vertical (na sexta semana de desenvolvimento), mas que na sétima semana ascende até alcançar uma posição horizontal em decorrência da decida da língua (MARTINELLI, 2020), Figura 3. Ambas as cristas palatinas se fusionam entre si e com o septo nasal, formando o palato mole e a úvula.

Atualmente, sabe-se que existem diversas vias e moléculas que estão envolvidas no desenvolvimento do palato; e uma alteração qualitativa e/ou quantitativa em suas funções podem ser cruciais para a surgimento de malformações (BEZERRA, 2020; BEATY, 2011; BÖHME, 2013; BUTALI, 2019).

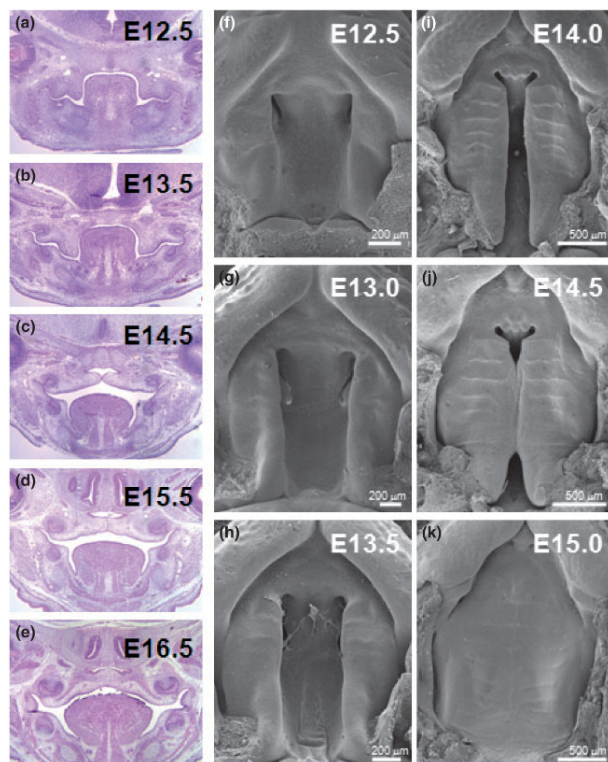


Figura 3 – Curso de tempo na formação do palato durante o desenvolvimento embrionário em camundongos. (a-e) Corado com hematoxilina e eosina no E12.5 (a), E13.5 (b), E14.5 (c), E15.5 (d) e E16.5 (e). (f-k) Imagens do microscópio eletrônico de varredura no E12.5 (f), E13.0 (g), E13.5 (h), E14.0 (i), E14.5 (j) e E15.0 (k). Fonte: IWATA, 2011

O desenvolvimento normal do lábio e do palato envolve uma série de eventos biológicos coordenados, incluindo proliferação, apoptose, migração e transição epitelial-mesenquimal (MACHADO et al. 2015; Figura 3 e 4), e qualquer modificação em um desses eventos pode afetar a morfogênese das estruturas faciais resultando nas fissuras.

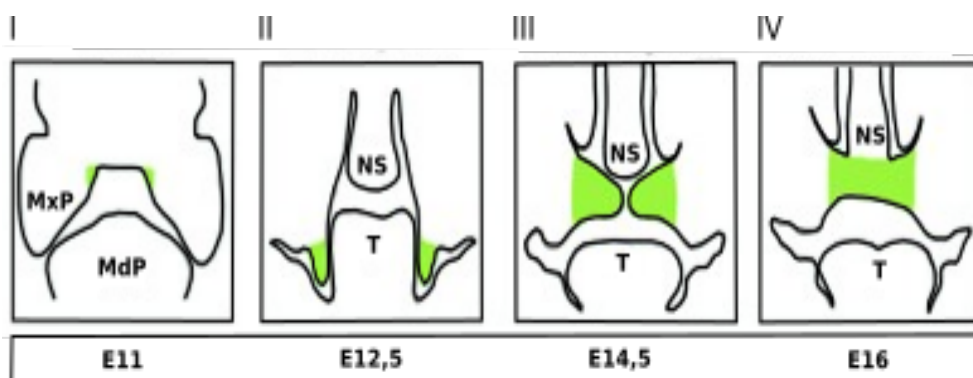


Figura 4. Processos de crescimento, elevação e fusão da prateleira palatina. **I** – iniciação. **II** – crescimento vertical. **III** - elevação e crescimento horizontal. **IV** - adesão e fusão. **Mxp** – processo maxilar. **MdP** – processo mandibular. **NS** – septo nasal. **T** – tongue. Destacado em verde – prateleiras palatinas.

CLASSIFICAÇÃO

Os sistemas de classificação são baseados na morfologia das fissuras e em princípios embrionários (SINGH, 2015). Os hospitais de referência brasileiro, especializados no tratamento destas malformações, adotam a classificação de SPINA (1972) modificada por SILVA (1992), que toma por base o forame incisivo. A classificação das fissuras orais, segundo Spina, depende da região anatômica envolvida e se divide basicamente em três (3) principais grupos: fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais (FL), fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP) e fissuras transforame incisivo ou fissuras lábio-palatinas (FLP), Figura 5.

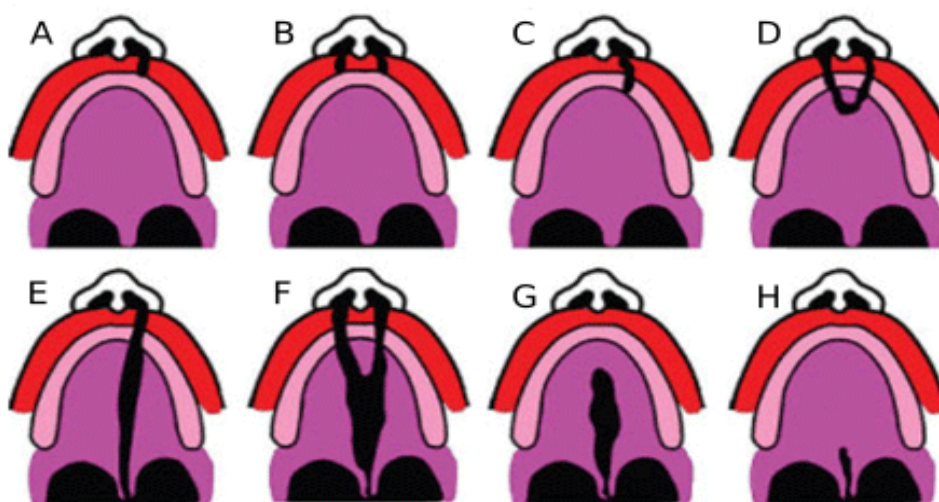


Figura 5 – Classificação das fissuras orais segundo Spina (REF). A – Fissura Labial Esquerda Pré-forame Incompleta. B – Fissura Labial Bilateral Pré-forame Incompleta. C – Fissura Labial Esquerda Pré-forame Completa. D – Fissura Labial Bilateral Pré-forame Completa. E – Fissura Labial Esquerda Transforame Completa. F – Fissura Labial Transforame Completa. G – Fissura Palatina Pós-forame Completa. H – Fissura Palatina Pós-forame Incompleta. Fonte: CYMROT, 2010.

A FL é o resultado da não fusão das proeminências nasais e maxilares (Figura 5 A-D), a FP ocorre quando os processos palatinos deixam de se fundir (Figura 5 G-H) e quando surge à falha nos dois processos ocorre a FLP (Figura 5 E-F). Destas três variantes, a FLP é duas vezes mais comum do que a FL e a FP (LEWIS, 2017), embora que em algumas regiões a FL ou a FP podem ter uma maior prevalência (YOW, 2021). Ademais, as malformações palatinas variam desde um pequeno corte (Figura 5 A, B e H) até as que comprometem mais de uma estrutura oral (Figura 5 C-G), sendo denominadas de incompleta e completa, respectivamente.

Um outro tipo de classificação divide cada subtipo descritos anteriormente em dois grupos: os não-sindrômico e os sindrômicos (PETER, 2009). A forma sindrômica representa 5% a 7% dos casos e consistem em mais de 200 condições. Ela é caracterizada pela presença de outras anomalias, além da fissura oral. Estas síndromes são comumente causadas por conta de anomalias cromossômicas e doenças monogênicas, podendo ser causadas devido a exposição aos fatores ambientais (STUPPIA, 2011). Em contrapartida, as não-sindrômicas representam de 93% a 95 dos casos, consistindo de malformações isoladas e não específicas que possuem uma etiologia multifatorial (STUPPIA, 2011).

FATORES DE RISCO

Os fatores de risco já relacionados com as fissuras orais dependem da hora, do lugar e do momento da morfogênese; dentre eles, os mais importantes são: socio-epidemiológico, contribuição étnica, histórico familiar, etilismo, tabagismo, dieta, ingestão de medicamento durante a gravidez, infecções e risco ocupacional (KAWALEC, 2015), resumidos na Tabela 1. Além disso, a interação entre os fatores genéticos, epigenéticos e ambientais podem influenciar significativamente na susceptibilidade.

Tabela 1 – Fatores de risco associados com fissuras orais.

Fatores de risco	
Tabagismo	- Gestantes fumantes possuem mais chances de ter crianças com malformação em dois terços do palato (KAWALEC, 2015).
Etilismo	- O risco aumenta com o aumento da dose diária de etanol, juntamente com a frequência de consumo (LEITE, 2009).
Dieta	- Uso de suplemento vitamínico durante a gravidez diminui o risco de malformações orais (JOHNSON, 2008).
Medicamento	- Corticosteroides, broncodilatadores, antineoplásico e anticonvulsivante aumentam o risco deste tipo de anomalias (PETER, 2009; KAWALEC, 2015)
Infecção	- Infecções virais aumentam a expressão do <i>IRF6</i> , aumentando o risco quando a gestante é infectada no primeiro trimestre (JIMÉNEZ,-FARFÁN, 2015).
Risco ocupacional	- Gestantes expostas a solventes orgânicos e agrotóxicos possuem uma maior chance de gerar uma criança com malformação (SHAW, 2003; GORDON 1981; KAWALEC, 2015).
Histórico familiar	- A presença de histórico familiar, em qualquer parente, aumenta a chance de ter um bebê com este tipo de alteração (KAWALEC, 2015). - Consanguinidade parental aumenta a chance de ocorrência de fissuras orais, podendo ser considerado um fator de risco isolado (SILVA, 2019).
Idade dos pais	- A idade dos pais, principalmente da mãe, está relacionado com a presença de fissuras orais na criança (DeRoo, 2003; VIEIRA, 2002).
Contribuição étnica	- Crianças africana possui menor chance de ter fissuras, enquanto as nativa americanas e asiáticas são mais susceptíveis de ter fissuras orais (DIXON, 2011). - A composição ancestral vem sendo relatado como um fator que importante para justificar as diferentes incidências em populações miscigenadas (AQUINO, 2014).

BIOLOGIA MOLECULAR POR TRÁS DA PALATOGÊNESE

O palato é formado pela união dos processos frontonasais, que dará origem ao palato primário, e dos dois processos maxilares laterais, que formará o palato secundário. O desenvolvimento normal do palato primário envolve diversos eventos moleculares e celulares que estão intensamente cronometrados; controlados em partes por genes da família dos Fatores de Crescimento (*FGF*, do inglês *Fibroblast Growth Factor*), das proteínas morfogenética óssea (*BMP4*, o inglês *Bone Morphogenetic Protein 4*; e *BMP7*, do inglês *Bone*

Morphogenetic Protein 7), *SHH* (do inglês, *Sonic Hedgehog*) e ácido retinóico (CARSTENS, 2002; LAN, 2015).

A expressão dos *FGFs* e *SHH* ao longo da borda medial da proeminência maxilar auxiliam na elevação e aproximação da prateleira palatal. O *SHH* é expresso no epitélio palatal e regula positivamente a expressão do *FGF10* através do fator de transcrição *OSR2*, no mesênquima palatal, e reprimindo a expressão do *FGF7* (LAN, 2015). O *FGF10* sinaliza, através do receptor *FGFR2B*, para manter a expressão do *SHH* no epitélio palatal. Em contrapartida, no mesênquima palatal, o *DLX5* ativa a expressão do *FGF7*; reprimindo a expressão do *SHH*. A expressão do *FGF7* é restrita ao lado nasal do mesênquima palatal, enquanto que a expressão do *SHH* é restrita ao lado oral do epitélio palatal. O *MSX1* mantém a expressão do *SHH* através do *BMP4*, no palato anterior; ao passo que o *PAX9* atua induzindo a expressão do *BMP4*, *FGF10*, *MSX1* e *OSR2*, no palato mesenquimal (LAN, 2015).

Tal como acontece no desenvolvimento do palato primário, o encerramento e a fusão do palato secundário exigem uma interação complexa dos movimentos das prateleiras palatais; onde uma coordenação tênue entre sinais proliferativos e apoptóticos ao longo da margem medial do epitélio das prateleiras palatais são minuciosamente cronometrados (MENG, 2009). Dentre os fatores envolvidos nesse processo, destacam-se: os fatores de crescimento; as proteínas da matriz extracelular; e as moléculas de adesão celular (MENG, 2009).

ASPECTOS EPIGENÉTICOS DA FISSURA ORAL

A epigenética é responsável por mecanismos moleculares que regulam a função gênica em diversos níveis, sem alterar a sequência do DNA; estas alterações são herdadas durante o processo de mitose e meiose (DUPONT, 2009). Os RNAs não-codificantes (ncRNA) são um dos componentes moleculares recém-descobertos desta maquinária.

RNAs não codificantes

RNAs não codificantes (ncRNAs) são moléculas de RNA que até o momento acredita-se que não são traduzidas em proteínas (ZHANG et al., 2019). Embora a funcionalidade dessas moléculas ainda não seja totalmente conhecida.

Em humanos, essas moléculas constituem aproximadamente 98% do genoma humano transcrito (MATTICK, 2001) e são agrupados em duas grandes classes de acordo com suas funções: (i) ncRNAs estruturais (ou *housekeeping*), que são moléculas de 50 a 500 pares de bases (pb) responsáveis pela manutenção da viabilidade celular - nessa categoria estão os RNAs ribossômicos (rRNAs), RNAs transportadores (tRNAs); e (ii) ncRNAs regulatórios, que são moléculas envolvidas na regulação da expressão gênica em todas as etapas, desde o nível pré-transcricional, transcricional, traducional e pós-transcricional (LATOWSKA et al., 2020) (Figura 6).

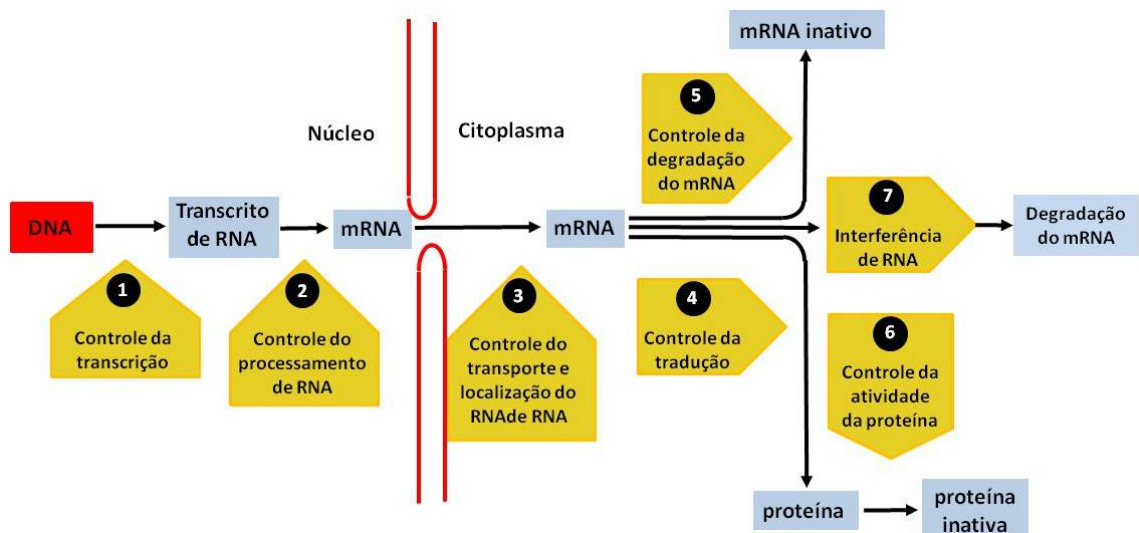


Figura 6- Os ncRNAs regulatórios, participam da regulação da expressão gênica em todas as etapas, desde o nível pré-transcricional (1), transcricional (1), traducional (4) e pós-transcricional. FONTE: <http://genmol.blogspot.com/2011/09/genetica-molecular-sinopse-do-controle.html>. Acessado em 18 de outubro 2021.

Os RNAs reguladores formam uma rede complexa de regulação do genoma, que silencia ou promove a expressão de genes de acordo com as necessidades da célula (ANASTASIADOU; JACOB; SLACK, 2017). Conseqüentemente, alterações no perfil de expressão dessas moléculas podem contribuir para desregular genes importantes no controle e manutenção da homeostase celular (RIBEIRO-DOS-SANTOS; CRUZ; DARNET, 2012).

Os ncRNAs regulatórios são classificados em outros dois grupos: (i) pequenos ncRNAs, que são transcritos com menos de 200 pb, incluindo, portanto, os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de interferência (siRNAs), pequenos RNAs nucleares (snRNAs), pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs) e RNAs associados a piwi (piRNAs); e (ii) longos ncRNAs, que são moléculas com mais de 200 pb que podem ser lineares (lncRNAs) ou circulares (circRNAs) (LATOWSKA et al., 2020) (Figura X). Dentre todos os ncRNAs, os mais frequentemente investigados são os miRNAs, circRNAs e lncRNAs.

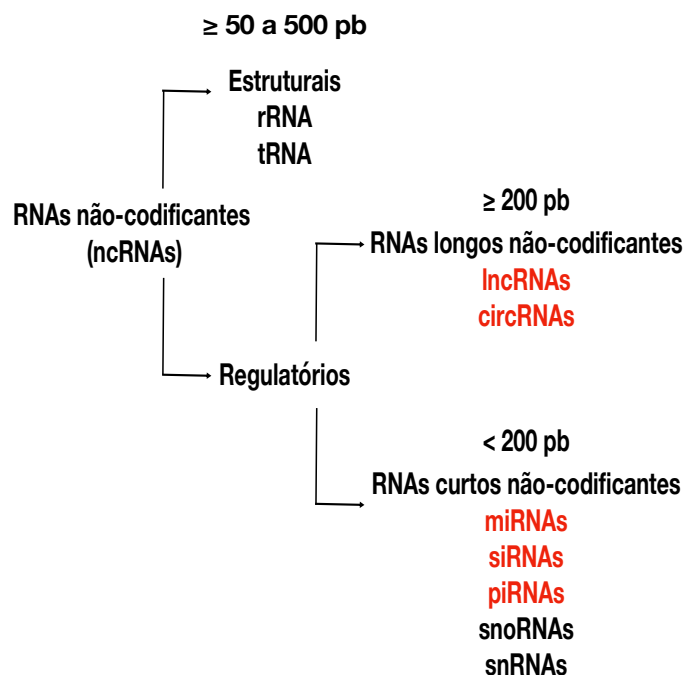


Figura 7 - Classificação dos principais RNAs não codificantes estruturais e regulatórios. Em destaque os mais investigados. Fonte: RIBEIRO-DOS-SANTOS; CRUZ; DARNET, 2012).

miRNA

Os miRNAs são moléculas de RNA não codificantes que possuem um tamanho aproximado de 21 pb na sua forma madura. Atuam no processo de regulação negativa gênica pós-transcricional, mediando a repressão de tradução ou a degradação de RNAs mensageiros (mRNAs) genes-alvos (MATSUYAMA; SUZUKI, 2019). Esses miRNAs são inicialmente produzidos no núcleo em uma estrutura de grampo com cauda poli-A e cap 5', chamada de miRNA primário (pri-miRNA). Em seguida, o pri-miRNA é processado em miRNA precursor (pré-miRNA) pela enzima RNase III Droscha em conjunto com algumas proteínas acessórias. Nesse momento, a Exportina-5 forma um complexo com outras proteínas, facilitando a sua exportação do núcleo para o citoplasma. No citoplasma, a enzima Dicer e suas proteínas acessórias clivam o pré-miRNA em um intermediário duplex, que posteriormente irá se associar a proteína Argonauta (AGO) para formar o complexo RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), no qual uma das fitas será selecionada como guia e atuará no reconhecimento de mRNAs alvos, enquanto a outra será degradada (Figura 7). Embora a biogênese anteriormente descrita seja a mais comum, outras biogêneses não canônicas também já foram reportadas, envolvendo processos independentes de Droscha ou de Dicer (MATSUYAMA; SUZUKI, 2019;).

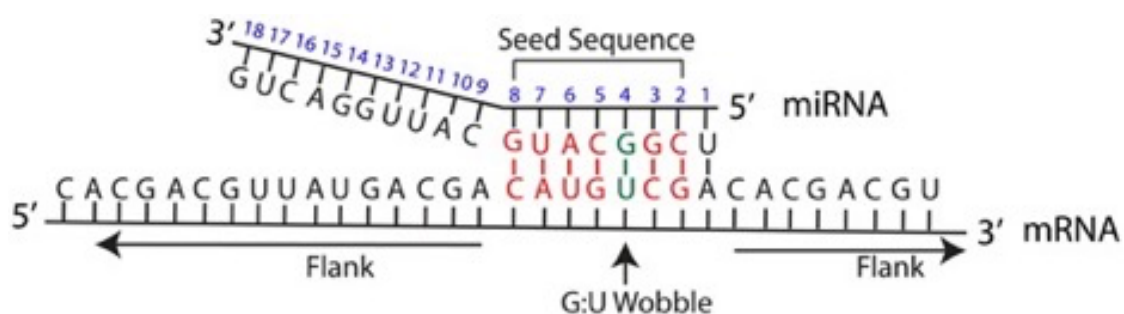


Figura 8 - Representação da estrutura do microRNA. Fonte:

<https://www.frontiersin.org/files/Articles/76191/fgene-05-00023->

Os microRNAs regulam a expressão aproximada de mais de 60% de todos os transcritos de proteínas em humanos. Sabe-se que cada gene pode ser regulado por diferentes miRNAs, e cada miRNA pode regular diferentes genes. Esse complexo mecanismos de regulação formam redes regulatórias e com efeito aditivo de regulação, desta forma cada miRNA pode suprimir vários genes e um mRNA pode ser alvo de vários miRNAs (Krol et al. 2010; Vera et al. 2013).

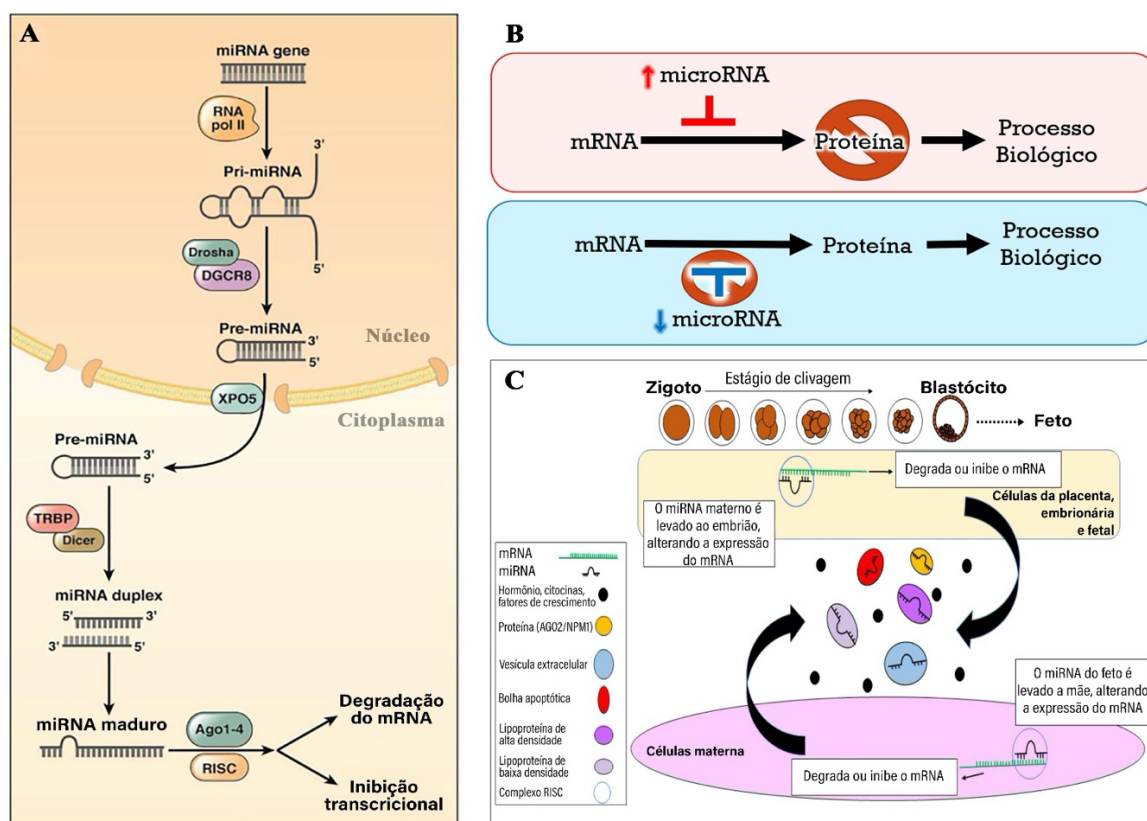


Figura 9 – Resumo ilustrativo representando a síntese e função dos microRNAs.

(A) Esquema demonstrando a biogênese nos microRNA. . (B) Esta figura mostra uma visão global da função do microRNA durante o processo de regulação pós-transcricional, de acordo com o perfil de expressão. (C) Representação da comunicação materno-fetal através do microRNA, ocorrendo atrás do contato direto entre as células ou por transferência, mediada por fluidos corporais (GROSS, 2017).

Os miRNAs regulam a expressão gênica a nível pós-transcricional, possibilitando a proliferação celular, a apoptose, o diferenciamento celular (WATERLAND, 2007; INBAR-

FEIGENBERG, 2013) e outras atividades cruciais para o desenvolvimento embrionário, Figura 9. Ademais, este grupo de moléculas podem servir como uma ferramenta de comunicação entre o embrião pré-implantado e a mãe (GROSS, 2017), Figura 9C.

Considerando que os miRNAs desempenhem um papel importante na palatogênese animal (SUZUKI, 2018) e humana (SCHOEN, 2018) ainda existe limitação no número de estudos específicos que avaliam a importância destes no desenvolvimento craniofacial humano, e de igual forma, em avaliar a expressão dos miRNAs em pacientes fissurados (RADHAKRISHNA, 2012).

Atualmente, este grupo de moléculas vem sendo o alvo de estudos, a fim de se compreender o seu papel nas malformações orais, Figura 10. Contudo, a maioria destes estudos utilizam o modelo animal ou *in silico*; havendo apenas quatro estudos que avaliam o perfil de expressão em humanos (WANG, 2017; SCHOEN, 2018; LI, 2016; ZOU, 2016). Ademais, três destes estudos (WANG, 2017; LI, 2016; ZOU, 2016) foram realizados na população chinesa, enquanto um foi realizado na Holanda (SCHOEN, 2018); mostrando a necessidade de mais estudos a fim de elucidar o papel do microRNA nas fissuras orais em outros grupos populacionais, como as miscigenadas.

Estudos recentes apresentam evidenciadas que alterações na expressão dos miRNAs em tecidos podem ser espalhadas nos fluídos biológicos, o que o torna um possível alvo de estudos para compreender o processo fisiopatológico (TURCHINOVICH, 2012; CHENG, 2015; KHO et al., 2018; CAMMARATA, 2018) e ajudar no monitoramento das fissuras orais (ZOU et al, 2016).

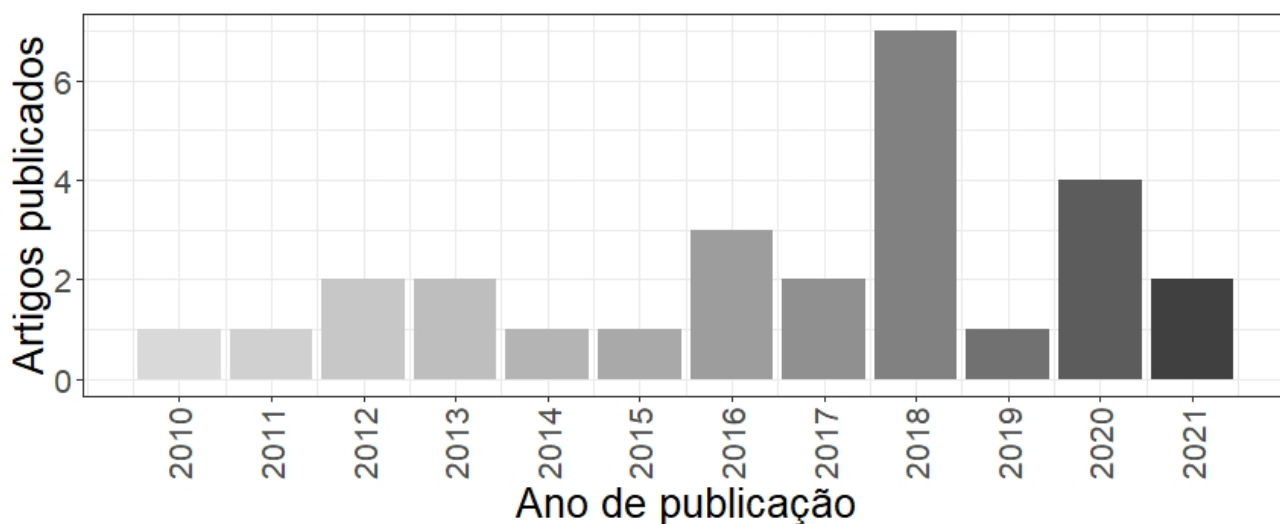


Figura 10 – Quantidade de artigos publicados que abordam o tema “Fissuras Orais” e “microRNA”, de acordo com o PubMed. Parâmetro de busca: ("Cleft Lip"[Mesh] OR "Cleft Palate"[Mesh] OR "Oral Cleft"[Mesh]) AND ("MicroRNAs"[Mesh] OR "Circulating MicroRNA"[Mesh]). Data da busca: 01 de setembro de 2021.

Dentre os microRNAs identificados pelo nosso grupo, 100 moléculas foram associadas com todos os subtipos de fissuras orais; evidenciando que os microRNAs podem estar assumindo um papel importante na palatogênese (MENDES, 2020). Outrossim, nove miRNAs foram apenas correlacionados com FP, sendo eles: *hsa-miR-181a-5p*, *hsa-miR-29c-5p*, *hsa-miR-3182*, *hsa-miR-451a*, *hsa-miR-549a*, *hsa-miR-92b-5p*, *hsa-miR-18a-5p*, *hsa-miR-92a-3p* e *hsa-miR-93-5p*. Apesar destes resultados reforçarem a teoria de que as fissuras labiais e palatinas possuem diferentes mecanismos regulatórios, eles necessitam ser validados por futuros estudos.

Em razão desses fatos expostos, em (RIBEIRO-DOS-SANTOS, 2010), o grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará (LGHM-UFPA) e do Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO) também da UFPA desenvolveram um grande estudo de sequenciamento de miRNAs no tecido gástrico humano e estabeleceram um perfil de referência, para tecidos saudáveis (RIBEIRO-DOS-SANTOS, 2010),). Desde então, o grupo vem desenvolvendo uma série de estudos em que se avaliam a

expressão do conjunto de todos os miRNAs no câncer gástrico, na busca de um potencial biomarcador (GOMES, 2014; MOREIRA, 2014; ASSUMPÇÃO, 2015; DARNET, 2015; VIDAL, 2016; MAGALHÃES, 2018).

Recentemente, o mesmo grupo vem ampliando o estudo sobre miRNAs em outras doenças, como por exemplo: no câncer oral (LOPES, 2018); no aneurisma hemorrágico (De PAIVA, 2018); na resposta imune a hanseníase (SALGADO, 2018) e no câncer colorretal (MARQUES, 2020). O presente estudo busca a identificação de biomarcadores regionais, que possam estar relacionados com o desfecho clínico de pacientes com fissuras orais do estado do Pará.

MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE

Mundialmente, são realizadas pesquisas que buscam à identificação de variantes genéticas que possam ter relação com o desenvolvimento de alterações e doenças monogênicas e complexas (International HapMap Consortium, 2003). Existe uma grande variação entre frequências alélicas dessas modificações em diferentes populações, o que pode ser resultante da deriva genética, da adaptação e de fatores seletivos (BALARESQUE ET AL., 2007; PENA ET AL., 2011)

Desse modo, é importante que dados genéticos de populações menos miscigenadas ou mais isoladas do ponto de vista migratório sejam extrapolados, com restrições, para outras populações como as que sofreram importante processo de miscigenação. Resultados de associação entre marcadores de suscetibilidade podem ser mal interpretados devido à presença de subestruturação populacional (PENA ET AL., 2011; SANTOS ET AL., 2010; ANDRADE ET AL., 2018) Ela ocorre quando uma população é constituída pela mistura de diferentes grupos étnicos (COLLINS-SCHRAMM ET AL., 2002). Estudos caso-controle realizados

nesse tipo de população devem possuir uma forma de controlar a estratificação populacional, evitando assim possíveis erros de interpretação (PENA 2011)

O Brasil é um país que possui uma população altamente miscigenada, composta principalmente por povos que apresentavam ancestralidades Europeia, Africana, Nativa Americana e Asiática. Diversos estudos têm ressaltado diferenças entre essas ancestralidades e as regiões brasileiras (BENEDET ET AL., 2012; DE AQUINO; 2014; VIEIRA-MACHADO 2016). Desta forma, para não realizar associações espúrias entre variáveis genéticas das distintas populações que formaram o povo brasileiro, é necessário a realização desse controle da ancestralidade, e para isso recomenda-se o uso de Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIM, Ancestry Informative Markers), ferramentas genéticas que permitem a distinção de populações parentais e a identificação de subestruturação em populações miscigenadas (PARRA ET AL., 2003). Esses marcadores autossômicos são importantes na determinação de ancestralidade genômica individual e populacional.

Inicialmente o grupo do LGHM da UFPA desenvolveu e validou um conjunto inicial de 48 AIM, desenvolvido por Santos et al. (2010), capaz de identificar um alto grau de subestruturação populacional na região Norte do Brasil e outras populações miscigenadas do país, com base nas contribuições Europeias, Africanas e Ameríndias. Mais tarde esse conjunto foi então empregado em diferentes estudos na determinação de ancestralidade individual e controle de possíveis erros de interpretação devido à subestruturação da população brasileira (Cardena et al., 2014; Colares et al., 2014; Lopes et al., 2014; Ota et al., 2014). Posteriormente, esse painel foi ampliado para 61 AIM pelo mesmo grupo de pesquisa e vem sendo aplicado com sucesso em diferentes trabalhos, sendo capaz de identificar também a contribuição Asiática no país (ANDRADE ET AL., 2018; Ramos et al., 2016a, 2016b).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Identificar o perfil de expressão global dos miRNAs em amostras de pacientes com fissura oral não sindrômica e seus controles sem fissura, da região norte do Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar as casuísticas do ponto de vista sócio-epidemiológico e de ancestralidade genômica.
- b) Mensurar o perfil diferencial de expressão dos miRNAs em indivíduos controles (CT) e pacientes acometidos com fissura lábio-palatino (FLP) não sindrômicos e comparar com a literatura.
- c) Analisar *in silico* os genes alvos dos microRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com fissura lábio-palatino (FLP) não sindrômicos; estabelecer as redes de interação destes genes na palatogênese.
- d) Sugerir miRNAs como possíveis biomarcadores de risco e/ou preditivos para o diagnóstico precoce da fissura oral em famílias e/ou populações de risco.

MATERIAIS E METODOLOGIA

APROVAÇÕES DOS COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA

Este projeto incorpora os aspectos éticos da Declaração de Helsinque e Nuremberg, assim como os recomendados pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa-CONEP (aprovação CAAE nº 09124619.2.0000.5634 – Plataforma Brasil). Todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. No caso de menores existe o consentimento dos responsáveis legais.

PACIENTES

As amostras foram divididas em dois grupos: caso e controle. O grupo caso foi composto por pacientes com diagnóstico de fissura oral, enquanto que o controle foi composto por indivíduos sem malformações orais. Ambos os participantes foram acompanhados, diagnosticados e tratados no Hospital Santa Casa do Pará (Belém-PA), sendo recrutados entre dezembro de 2019 e fevereiro de 2020 (Figura 7).

Conforme rotina do setor, todos os pacientes selecionados portadores de fissura oral, foram examinados pela equipe multidisciplinar do Centro de Referência em Fissuras e Anomalias Craniofaciais - CREFAC do Hospital Santa Casa do Pará, cidade Belém-PA e apenas pacientes com a forma não-sindrômica foram incluídos. Os participantes devem possuir a faixa etária entre 2 e 160 meses de idade, serem cadastrados na Gerência de Ambulatório (GAMB) da unidade e se submetendo a um procedimento cirúrgico. Tanto o

sangue periférico foi coletado de todos os participantes. As informações clínicas e sociodemográficas foram obtidas através de questionário e registro clínico.

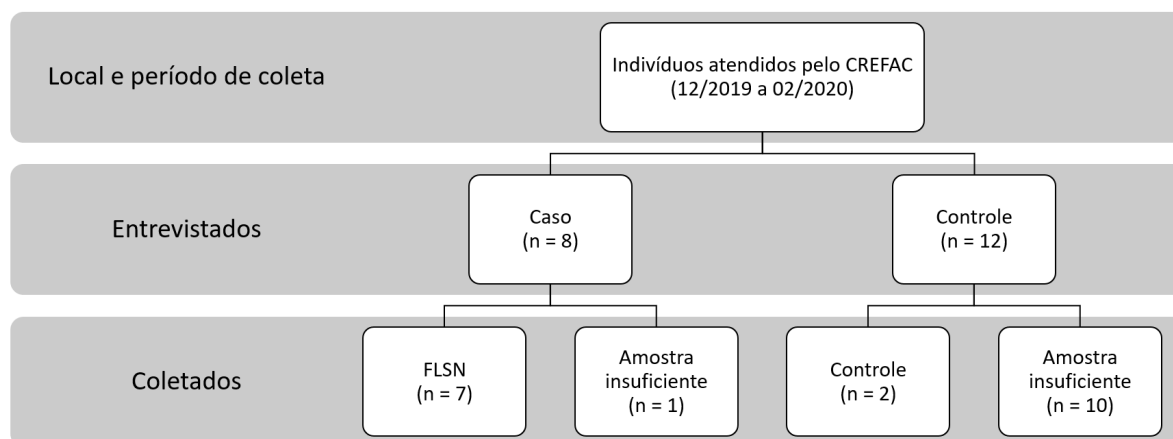


Figura 11 - Descrição dos grupos e detalhamento da quantidade e origem das amostras.

COLETA DAS AMOSTRAS

Os participantes tiveram o 1 mL do sangue periférico coletado e armazenado em tubos Tempus Blood RNA (Thermo Fisher Scientific - US) de indivíduos do Grupo; sendo armazenado a -20°C até a extração do material genético. Todas as amostras foram armazenadas no Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA.

ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR

Extração de RNA total

O RNA total foi extraído partir do sangue periférico armazenado em tubos Tempus Blood RNA (Thermo Fisher Scientific), utilizando o TRIzol LS Reagent (Thermo Fisher Scientific); seguindo o protocolo do fabricante.

A quantificação das amostras e a avaliação da integridade foram os parâmetros de qualidade pré-analíticas adotadas. As amostras de RNA total obtidas foram quantificadas utilizando-se o equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) e o kit Qubit RNA HS Assay. A integridade das amostras de RNA total foi avaliada utilizando-se o kit RNA ScreenTape Assay (Agilent Technologies) no equipamento TapeStation 2200 (Agilent Technologies).

Small RNA-Seq e preparação das bibliotecas (miRNoma)

A análise da expressão global de miRNAs foi avaliada utilizando-se a técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Foram preparadas 09 bibliotecas de *Small RNA-Seq* (07 com fissura oral e 02 de controles) realizadas a partir 1 ug de RNA total por amostra, utilizando-se o kit *TruSeq Small RNA Library Prep* (Illumina). As bibliotecas foram sequenciadas no *NextSeq Sequencing System* (Illumina), utilizando-se o kit *NextSeq 500/500 Mid Output v2* (Illumina),

Análise dos dados de RNA-Seq

As leituras geradas foram transferidas para um workstation computacional, onde elas foram pré-processadas utilizando-se o software *Trimmomatic* v.0.32 para remover contaminantes e leituras de baixa qualidade. O resultante foi alinhado ao genoma referência humano (versão *hg19*) utilizando-se o alinhador *STAR* v.2.6 e as leituras correspondentes a miRNA, e outros *small non-coding RNA* (sncRNA) onde foram identificadas utilizando o programa *htseq* v.0.9 com a referência do *mirBase* (versão 21). O número de leituras por transcrito de miRNA foi utilizado para análise de expressão diferencial utilizando o pacote estatístico *DESeq2* v.3.7 na linguagem estatística R v.3.5 que determinou os miRNAs com expressão diferencial: entre controle e os pacientes investigados.

Análise Funcional

A análise funcional será dividida em duas etapas. A primeira é a seleção dos genes alvos e a segunda é a ontologia, propriamente dita. Para a seleção dos genes alvos, foi utilizado a ferramenta miRTargetLink Human; sendo utilizados para a fazer a anotação funcional e enriquecimento das vias, através do pacote do R “clusterProfiler” (doi: 10.1089/omi.2011.0118).

CARACTERIZAÇÃO DA ANCESTRALIDADE GENÔMICA

A caracterização da ancestralidade Europeia, Africana e Ameríndia das amostras foi realizada com um painel de 61 marcadores genéticos bialélicos do tipo de inserção/deleção (INDELs) previamente validados como marcadores informativos de ancestralidade, conforme descrito por Santos et al., 2010 e depois modificado por Andrade et al., 2018.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS

O presente estudo contou com a participação de sete indivíduos diagnosticados com fissuras orais e dois voluntários sem anomalias craniofaciais. A Tabela 2 mostra as características demográficas dos participantes deste estudo. O tipo de fissura oral que obteve maior prevalência foi a FLP bilateral completa, representando 62,5% dos casos.

Tabela 2 – Características demográficas dos participantes.

Característica	Casos (n = 8)	Controle (n = 12)
Idade da criança (meses)	50	71
Sexo (M/F)	5 (62,5 %) / 3 (37,5 %)	9 (75,0 %) / 3 (25,0 %)
Tipo de fissura diagnosticada		
a) FL isolada completa unilateral	1 (12,5 %)	-
b) FLP completa unilateral esquerda	2 (25,0 %)	-
c) FLP bilateral completa	5 (62,5 %)	-
Idade da mãe (anos)*	24,1 ± 7,3	22,4 ± 3,9
Idade do pai (anos)*	26,8 ± 5,4	24,5 ± 4,2
Renda familiar		
a) Um salário	4 (50,0 %)	3 (25,0 %)
b) Dois salários	4 (50,0 %)	8 (66,7 %)
c) Três salários	0 (0,0 %)	1 (8,3 %)

* Média e desvio padrão.

Comparando o perfil genético obtido para os 61 marcadores de ancestralidade do tipo INDEL, foi possível observar que o grupo caso possui uma maior contribuição nativa americana (Figura 12); enquanto o grupo controle possui uma maior contribuição europeia.

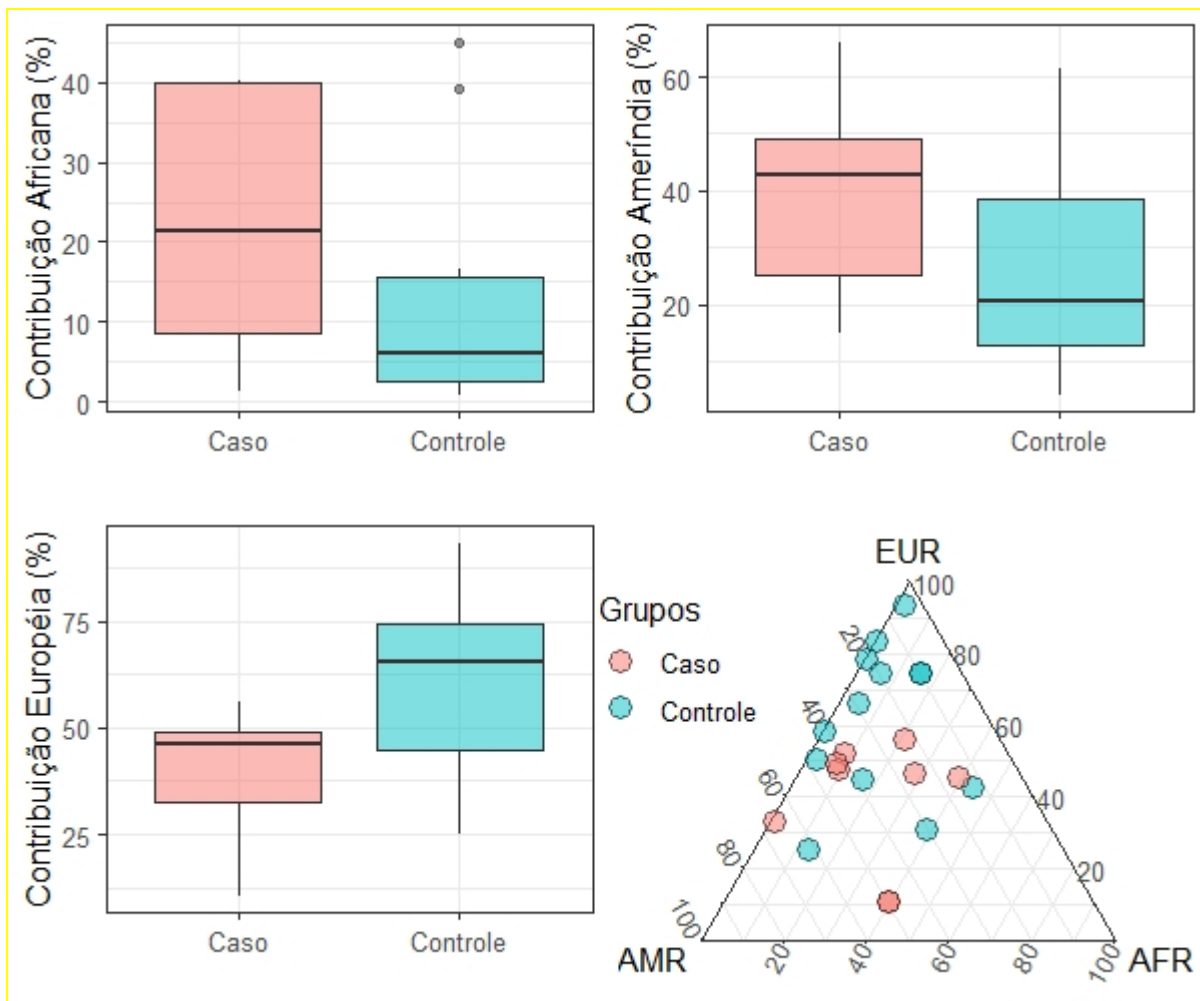


Figura 12 – Gráfico comparativo entre o padrão de ancestralidade genômica relativa dos grupos caso e controle.

EXPRESSÃO DOS miRNAS E EXPRESSÃO DIFERENCIAL

Foi analisado o perfil de expressão global de sete indivíduos do grupo caso e dois indivíduos do grupo controle, o restante das amostras foram excluídos desta análise pela quantidade insuficiente de dados e por não passarem pelos critérios de qualidade pré-analíticos (quantificação e integridade).

Das amostras analisadas, após o controle de qualidade, alinhamento e quantificação do transcrito, o número de *reads* mapeadas por amostras variou entre 297.696 a 656.161. De um

total de 2.576 miRNAs conhecidos, 178 miRNAs apresentaram mais do que dez *reads* mapeadas e foram selecionados para as futuras análises. Considerando este parâmetro, o miRNA mais abundante foi *hsa-miR-486-5p* (responsável por 67,60% da expressão); seguido por *hsa-miR-92a-3* (5,59 %), *hsa-miR-16-5p* (3,31 %), *hsa-miR-451a* (3,02 %) e *hsa-miR-181a-5p* (2,53 %).

A análise diferencial foi realizada seguindo o modelo de estudo do tipo caso-controle e foram identificados 16 microRNAs diferencialmente expressos, como mostrado na Figura 13. Mesmo mediante ao baixo número amostral, foi possível observar que os dois grupos conseguem se distinguir (Figura 13A); onde nove destes miRNAs evidenciaram uma clara distinção de expressão entre os grupos (*hsa-miR-181b-5p*, *hsa-miR-660-5p*, *hsa-miR-126b-3p*, *hsa-miR-181a-3p*, *hsa-miR181a-2-3p*, *hsa-miR-324-3p*, *hsa-miR-381-3p*, *hsa-miR-598-3p* e *hsa-miR-769-5p*). Contudo, em detrimento ao baixo número amostral, essa discriminação não foi possível de ser observada através da análise de componente principal (Figura 13C).

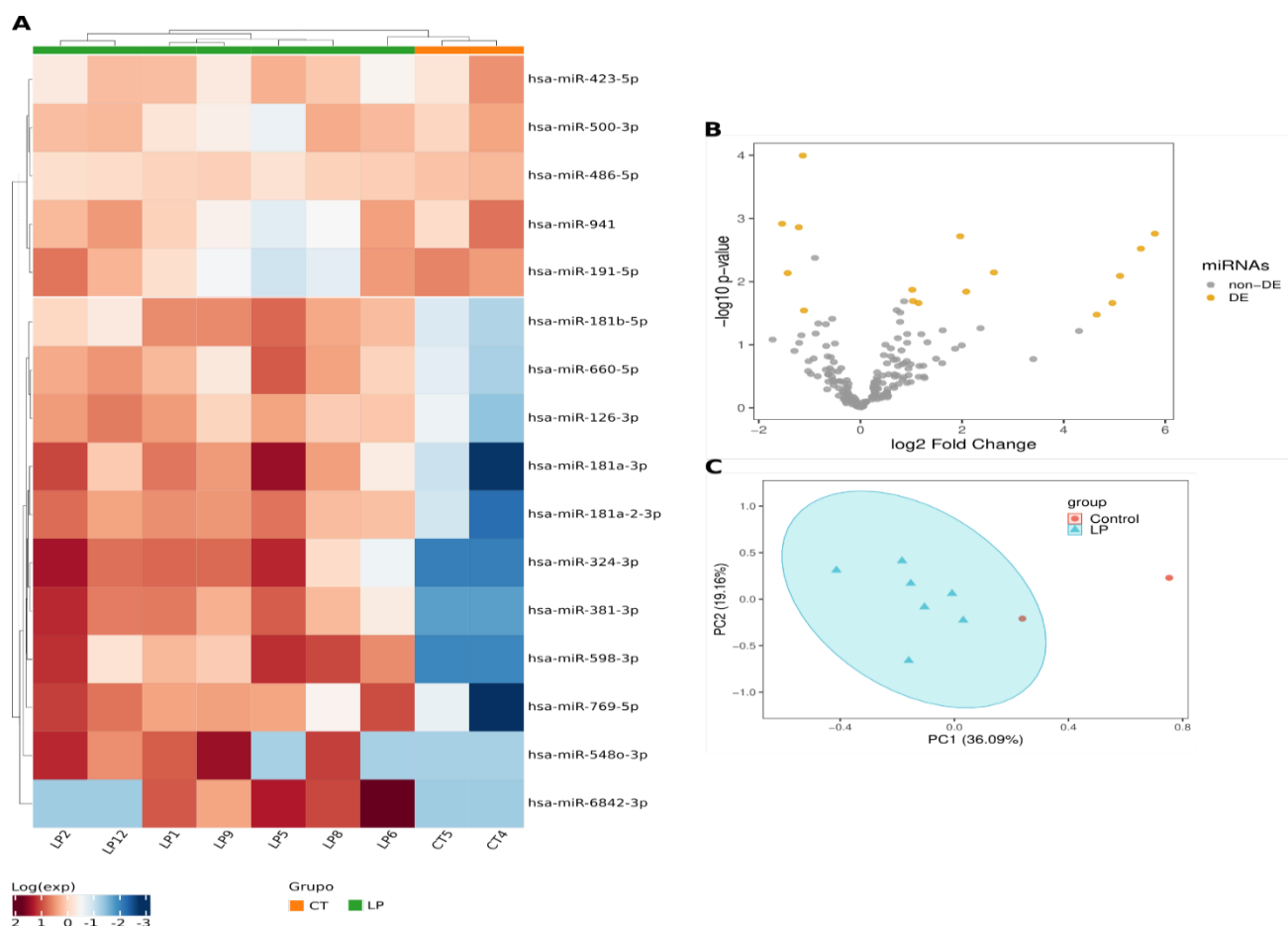


Figura 13 Perfil de expressão diferencial de expressão dos miRNAs em indivíduos controles (CT) e pacientes acometidos com fissure lábio-palatino (LP) não sindrômicos. **A** Mapa de calor apresentando a expressão dos miRNAs. **B** Gráfico volcano apresentando os miRNAs diferencialmente expressos. **C** Gráfico de Análise de componentes principais – PCA.

No presente estudo observou-se 16 miRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes de fissura oral, dos quais nove (9) miRNAs apresentaram resultados significativamente distintos quando comparados ao grupo controle investigado (Figura 12). Uma revisão sistemática (database: PROSPERO - <http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO>, registered CRD 42018086406) realizada pelo presente grupo comparou os achados obtidos nesta revisão com os dados do presente estudo (Figura 14 e 15).

	CLP	CP	CL
hsa-let-7a-5p	1	1	
hsa-let-7f-5p	2	2	1
hsa-miR-1182	3	2	1
hsa-miR-1185-2-3p	3	2	1
hsa-miR-1226-5p	3	2	1
hsa-miR-1249-3p	3	2	1
hsa-miR-126-5p	1	1	
hsa-miR-133b	1		
hsa-miR-1343-5p	1		
hsa-miR-139-3p	2	2	1
hsa-miR-144-5p	2	2	1
hsa-miR-150-5p	2	2	1
hsa-miR-16-2-3p	1		
hsa-miR-17-3p	2	2	1
hsa-miR-18a-5p	1	1	
hsa-miR-194-5p	1	1	
hsa-miR-195-5p	2	2	1
hsa-miR-198	1		
hsa-miR-215-5p	3	2	1
hsa-miR-27b-3p	3	2	1
hsa-miR-301a-3p	1	1	
hsa-miR-30b-5p	3	2	1
hsa-miR-30c-1-3p	3	2	1
hsa-miR-30c-5p	2	2	1
hsa-miR-3137	1		
hsa-miR-3156-5p	3	2	1
hsa-miR-3158-5p	3	2	1
hsa-miR-340-5p	1	1	
hsa-miR-3617-5p	1		
hsa-miR-3648	2	2	1
hsa-miR-365a-3p	1		
hsa-miR-3713	1		
hsa-miR-374a-5p	3	2	1
hsa-miR-376a-3p	1		
hsa-miR-376c-3p	1		
hsa-miR-377-3p	1		
hsa-miR-3917	1		
hsa-miR-3945	3	2	1
hsa-miR-424-5p	3	2	1
hsa-miR-4314	3	2	1
hsa-miR-4417	3	2	1
hsa-miR-4485-3p	1		
hsa-miR-4496	3	2	1

	CLP	CP	CL
hsa-miR-4508	3	2	1
hsa-miR-4673	2	2	1
hsa-miR-4688	3	2	1
hsa-miR-4698	2	2	1
hsa-miR-4707-3p	3	2	1
hsa-miR-4716-3p	3	2	1
hsa-miR-4734	3	2	1
hsa-miR-4740-5p	1		
hsa-miR-4746-3p	1		
hsa-miR-4753-5p	1		
hsa-miR-4755-3p	1		
hsa-miR-4769-5p	3	2	1
hsa-miR-4793-5p	1		
hsa-miR-516a-5p	1		
hsa-miR-532-5p	2	2	1
hsa-miR-550a-3-5p	3	2	1
hsa-miR-564	3	2	1
hsa-miR-5699-5p	1		
hsa-miR-601	3	2	1
hsa-miR-6071	3	2	1
hsa-miR-6133	3	2	1
hsa-miR-652-3p	1	1	
hsa-miR-659-3p	1		
hsa-miR-660-5p	3	2	1
hsa-miR-663a	3	2	1
hsa-miR-6716-5p	1		
hsa-miR-6734-5p	1		
hsa-miR-6738-5p	3	2	1
hsa-miR-6747-5p	1		
hsa-miR-6748-5p	3	2	1
hsa-miR-6758-5p	3	2	1
hsa-miR-6769a-5p	1		
hsa-miR-6774-5p	3	2	1
hsa-miR-6777-3p	3	2	1
hsa-miR-6784-5p	3	2	1
hsa-miR-6788-5p	1		
hsa-miR-6793-5p	1	1	
hsa-miR-6800-5p	1		
hsa-miR-6807-5p	3	2	1
hsa-miR-6820-5p	2	2	1
hsa-miR-6845-5p	1		
hsa-miR-6846-5p	1		
hsa-miR-6851-5p	1		
hsa-miR-6881-5p	1		

	CLP	CP	CL
hsa-miR-6887-5p	3	2	1
hsa-miR-6889-5p	3	2	1
hsa-miR-7109-5p	3	2	1
hsa-miR-711	3	2	1
hsa-miR-7114-5p	2	2	1
hsa-miR-7-5p	1		
hsa-miR-769-3p	1		
hsa-miR-8060	3	2	1
hsa-miR-8089	3	2	1
hsa-miR-877-5p	3	2	1
hsa-miR-92a-3p		1	
hsa-miR-93-5p		1	
hsa-miR-936	1		
hsa-miR-96-5p	1	1	1

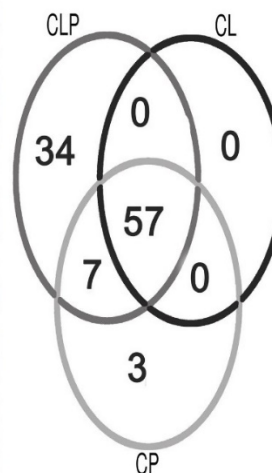


Figura 14 – Lista de miRNAs *upregulated* de acordo com o tipo de fissura oral. O valor numérico indica quantos estudos associaram o correspondente miRNA com o tipo de malformação oral. O diagrama de Venn indica a quantidade de miRNAs que cada tipo de fissura compartilha em comum. CLP – Fissura labiopalatina. CL – Fissura labial. CP – Fissura palatina. Ref: doi: 10.1111/jop.12950.

Dentre estes o *hsa-miR-660-5p* foi o único que corroborou a associação com FLP em estudos prévios, indicando que os outros oito miRNAs foram identificados pela primeira vez como potenciais novos biomarcadores ligados a fissura oral.

	CLP	CP	CL
hsa-miR-122-5p	1	1	
hsa-miR-1237-3p	3	2	
hsa-miR-1238-3p	1		
hsa-miR-1260a	2	2	1
hsa-miR-1281	3	2	1
hsa-miR-1304-3p	3	2	1
hsa-miR-181a-5p		1	
hsa-miR-1825	3	2	1
hsa-miR-191-3p	3	2	1
hsa-miR-193a-5p	2	2	1
hsa-miR-221-3p	2	2	1
hsa-miR-29c-5p		1	
hsa-miR-3162-3p	1		
hsa-miR-3182		1	
hsa-miR-3187-3p	3	2	1
hsa-miR-338-3p	3	2	1
hsa-miR-4286	2	2	
hsa-miR-4290	3	2	1
hsa-miR-4428	2	2	1
hsa-miR-4433a-5p	3	2	1
hsa-miR-4455	3	2	1
hsa-miR-4486	1		1
hsa-miR-451a		1	
hsa-miR-4649-3p	3	2	1
hsa-miR-4664-3p	1		
hsa-miR-4668-5p	3	2	1
hsa-miR-4706	1		
hsa-miR-4728-5p	2	2	1
hsa-miR-4738-3p	1	1	1
hsa-miR-4738-5p	1	1	
hsa-miR-4749-3p	2	2	1
hsa-miR-4769-3p	3	2	1
hsa-miR-483-3p	1	1	
hsa-miR-494-3p	2	2	1
hsa-miR-497-3p	1	1	
hsa-miR-505-3p	1		
hsa-miR-549a		1	
hsa-miR-574-3p	1	1	
hsa-miR-574-5p	3	2	1
hsa-miR-584-5p	1		
hsa-miR-619-5p	1		
hsa-miR-636	3	2	1
hsa-miR-6508-5p	3	2	1

	CLP	CP	CL
hsa-miR-6515-3p	2	2	1
hsa-miR-6515-5p	1		
hsa-miR-6732-3p	3	2	1
hsa-miR-6737-3p	1		
hsa-miR-6751-3p	3	2	1
hsa-miR-6776-5p	3	2	1
hsa-miR-6785-5p	2	2	1
hsa-miR-6797-3p	3	2	1
hsa-miR-6800-3p	3	2	1
hsa-miR-6813-3p	3	2	1
hsa-miR-6851-3p	3	2	1
hsa-miR-6861-3p	3	2	1
hsa-miR-6870-3p	3	2	1
hsa-miR-6873-3p	3	2	1
hsa-miR-6880-3p	3	2	1
hsa-miR-6892-5p	1		
hsa-miR-7111-3p	3	2	1
hsa-miR-7114-3p	3	2	1
hsa-miR-7641	2	2	1
hsa-miR-766-3p	2	2	1
hsa-miR-7975	2	2	1
hsa-miR-7977	2	2	1
hsa-miR-8073	2	2	1
hsa-miR-92b-5p		1	

Figura 15 – Lista de miRNAs *downregulated* de acordo com o tipo de fissura oral. O valor numérico indica quantos estudos associaram o correspondente miRNA com o tipo de malformação oral. O diagrama de Venn indica a quantidade de miRNAs que cada tipo de fissura compartilha em comum. CLP – Fissura labiopalatina. CL – Fissura labial. CP – Fissura palatina. Ref: doi: 10.1111/jop.12950.

A fim de melhorar o entendimento das vias que possam estar associadas com os miRNAs diferencialmente expressos, foi realizado uma análise funcional dos genes alvos. Foram identificados 94 genes alvos, dos quais foram utilizados para a análise de

enriquecimento de vias. Estes genes demonstraram estar associados a duas vias que envolvidas na formação do palato, a via de sinalização da HIF-1 e da apoptose (Figura 16).

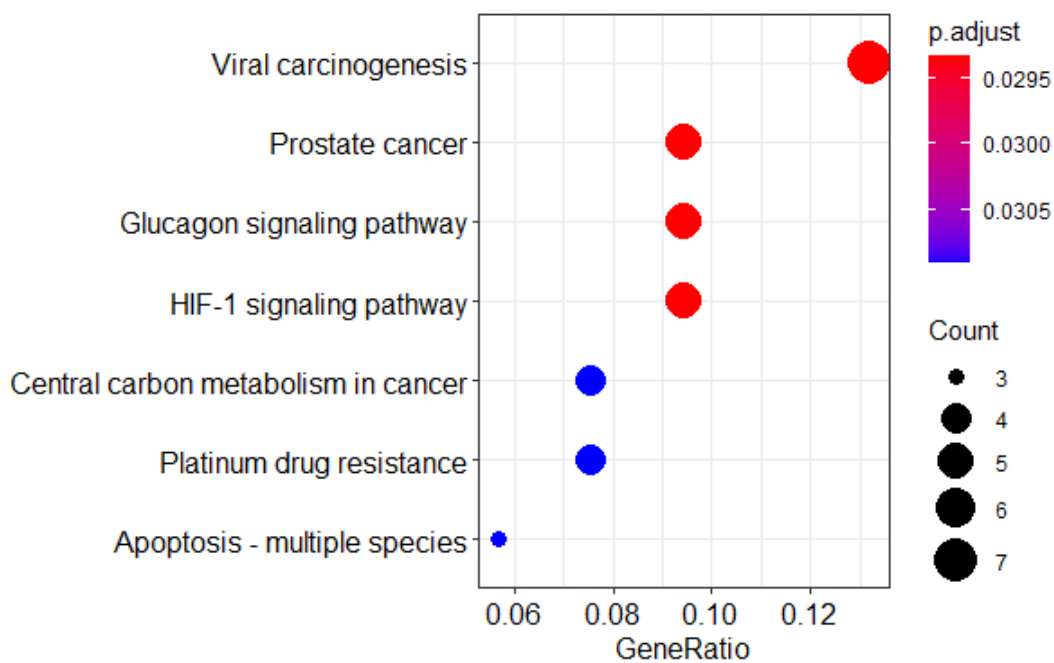


Figura 16 – Análise de enriquecimento dos genes alvo dos miRNAs.

Em seguida, foram selecionados os genes alvos destas duas vias, para construir uma rede regulatória com os correspondentes miRNAs (Figura 17). Dos nove (9) miRNAs diferencialmente expressos, os *hsa-miR-769-5p*, *hsa-miR-181a-2-3p*, *hsa-miR-323-3p* e *hsa-miR-181b-5p* apresentaram ter papéis chaves no regulamento destas vias, uma vez que regulam mais de um gene, como observado na Figura 17.

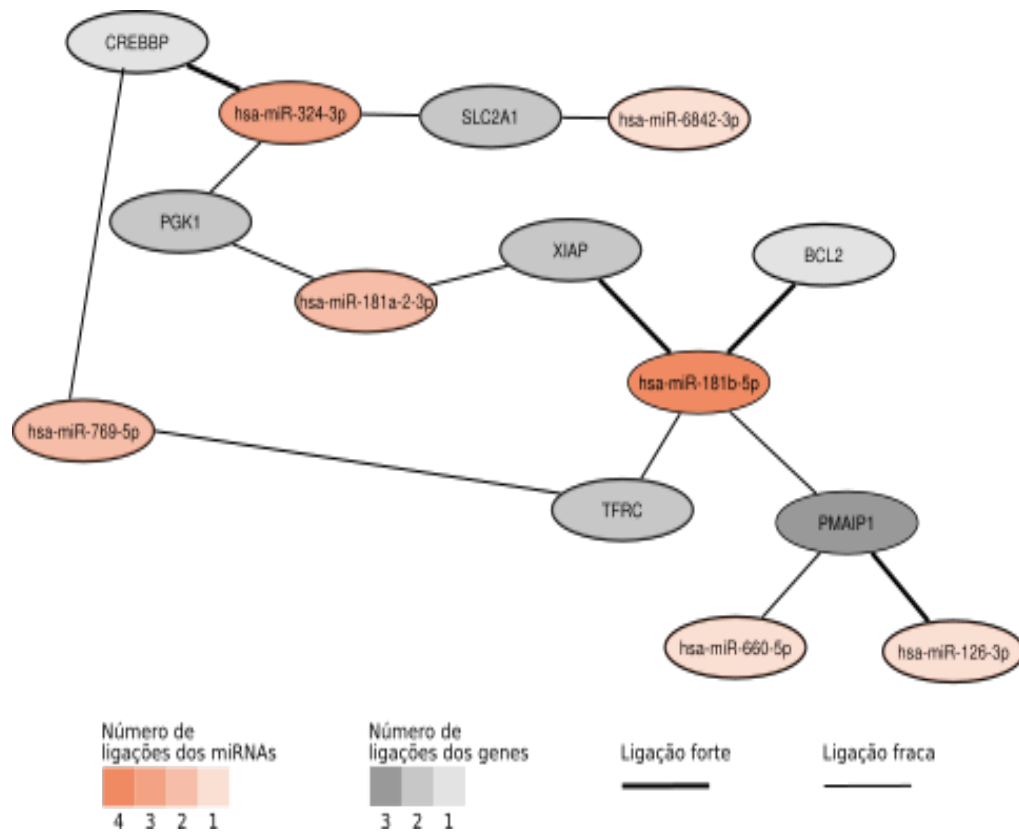


Figura 17 - Rede dos miRNAs diferencialmente expressos dos FLP e seus genes alvos. A intensidade das cores aponta para a quantidade de ligações. O traço indica se a ligação é forte ou fraca.

DISCUSSÃO

A incidência das fissuras orais pode variar de acordo com o processo de formação populacional de um continente, região ou país, portanto em populações miscigenadas como o Brasil, este processo estará submetido a influência de diversas contribuições ancestrais (De AQUINO, 2014; VIEIRA-MACHADO, 2016). Por outro lado, em muitas outras doenças comuns a soma de todas as variantes genéticas conhecidas explica apenas uma pequena porcentagem dos casos. Portanto, uma explicação alternativa que pode estar envolvida no processo de adoecimento é a influência de mecanismos regulatórios moleculares, como os epigenéticos, que podem impactar na apresentação final de uma característica, como um fenótipo (ALVIZI, 2017). Contudo, existe um número limitado de estudos que investigaram o papel da modulação epigenética nas fissuras orais em humanos, sendo ainda mais restritos quando se avalia o papel do perfil de miRNAs (MENDES, 2020). Mediante a isso, o presente estudo se constitui no primeiro trabalho que investigou o perfil de miRNAs relacionado com o surgimento deste tipo de malformação em populações miscigenadas.

O estudo identificou 16 miRNAs diferencialmente expressos. Destes, nove miRNAs evidenciaram uma clara distinção de expressão entre os grupos (*hsa-miR-181b-5p*, *hsa-miR-181a-3p*, *hsa-miR181a-2-3p*, *hsa-miR-660-5p*, *hsa-miR-126b-3p*, *hsa-miR-324-3p*, *hsa-miR-381-3p*, *hsa-miR-598-3p* e *hsa-miR-769-5p*). Ademais, comparando esses 16 miRNAs diferencialmente expressos com a literatura (MENDES, 2020), foi possível observar que um miRNA já havia sido associado previamente com FLP (*hsa-miR-660-5p*). Contudo, embora vem sendo identificado e investigado o papel dos miRNAs no processo de desenvolvimento embrionário, a função da grande maioria deles ainda permanece não definida (GROSS, 2017).

A família do *miR-181* contém quatro miRNAs extremamente conservados (*miR-181a*, *miR-181b*, *miR-181c* e *miR-181d*), cujos genes do *miR-181a* e *b* estão agrupados juntos no

cromossomo 1 e 9 (YANG, 2017). Esta família de miRNAs é crucial para o desenvolvimento embrionário (INDRIERI, 2020), regulando a apoptose, a proliferação e a diferenciação celular através da sinalização do TGF- β (IWATA, 2011). Além disso, o aumento da expressão do cluster *miR-181a/b* resulta na letalidade do embrião e, nos casos sobreviventes, em malformação craniana (CARRELLA 2015) (Figura 18).

O *miR-126-3p* é um miRNA intrônico, localizado no íntron 7 do gene *EGFL7* do cromossomo 9 (NIKOLIC, 2010). Este miRNA atua inibindo a proliferação celular e induzindo o processo de apoptose (WU, 2016), pela via PI3K/PDK1/AKT (ICHIKAWA, 2020). Esta via de sinalização (Figra 18) é responsável pelo processo de diferenciação das células pluripotentes e, quando comprometida, impacta na transição epitelial-mesenquimal (EMT) durante o desenvolvimento craniofacial (KANG, 2005).

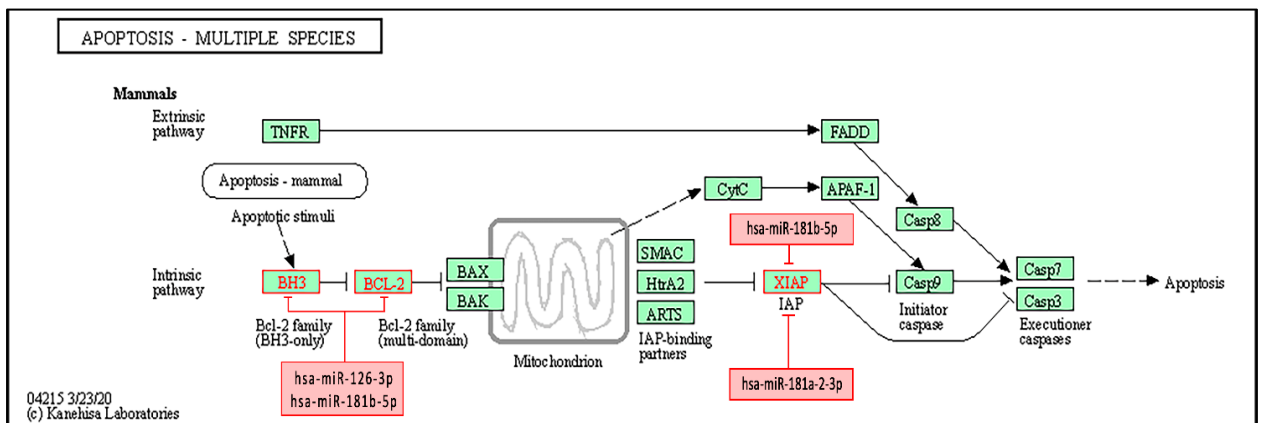


Figura 18. Via metabólica apoptose dos genes alvos dos miRNAs expressamente identificados no grupo pacientes acometidos com fissura lábio-palatino (FLP) não síndrômicos.

O *miR-660-5p*, localizado na região cromossômica Xp11.23, aparenta ter um papel importante no metabolismo ósseo; podendo ser um marcador para predizer anomalias neste

órgão (VALASSI 2019). Este miRNA regula a migração celular e proliferação (He, 2017), através da ativação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR (PENG, 2020). Esta via de sinalização possui um papel crucial em diversas funções celulares (YU, 2016), incluindo o controle da autofagia e a diferenciação osteogênica (SHI, 2019). Uma perturbação nesta via de sinalização pode resultar na malformação orofacial (SHI, 2019).

O *miR-324-3p* está localizado na região do cromossomo 17p13.1 (KIM, 2003) e o aumento da sua expressão pode afetar significativamente a proliferação celular e o processo de apoptose (ZHANG, 2017), através das vias da caspase-9/BCL2/BCL-xL e do EMT/p-AKT (LIU, 2017). Enquanto o *miR-381* está localizado na região do cromossomo 14q32.31, junto com um grupo de miRNAs dentro de 20 kb (XU, 2013). Este miRNA regula a apoptose por regular o fator de necrose tumoral (TNF), inibindo a ativação da CASP8 e CASP3 (ZHAO, 2020). As vias reguladas por estes dois miRNAs atuam juntas na palatogênese, durante o processo de fusão da concha palatal (SOENO, 2006); induzindo a apoptose da margem medial das conchas (Figura 18).

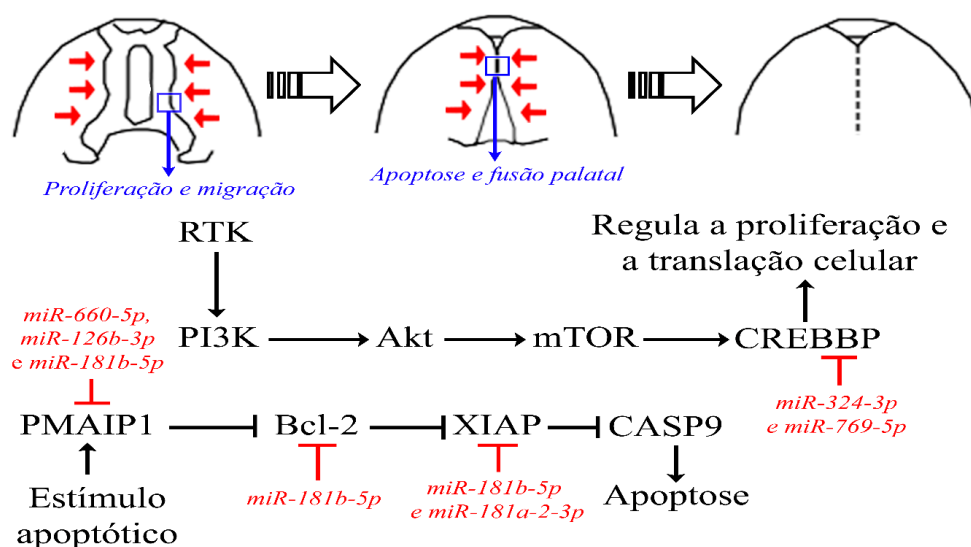


Figura 18 – Esquema ilustrativo do papel dos miRNA identificados na palatogênese.

O *miR-598-3p*, localizado na região cromossômica 8p23.1, regula a proliferação e migração (YANG, 2018); diminuindo a transição epitelial-mesenquimal através da inibição da via de sinalização JAG/Notch2 (MA, 2019), dificultando a adesão entre as conchas palatais (CASEY, 2017). Ademais, o *miR-769-5p*, que está localizado na região cromossômica 19q13.32 (LUAN, 2020), inibe a proliferação e a migração celular (YANG, 2017); comprometendo a elevação das conchas palatais, resultando fissuras orais.

O enriquecimento global dos nove miRNAs diferencialmente expressos evidenciou que eles podem estar atuando nas vias de sinalização do HIF-1 (KÜCHLER, 2018) e da apoptoses (LIU, 2020), nos quais foi possível identificar quatro genes alvos (*BLC2*, *CREBBP*, *PMAIP1* e *XIAP*) relacionados com a formação das estruturas craniofaciais (SALEEM, 2019; YAN 2020; INDENCLEEF, 2018; LI, 2019). Esses achados evidenciam que estes miRNAs possuem um papel significante na palatogênese e na etiologia das fissuras orais (Figura 19).

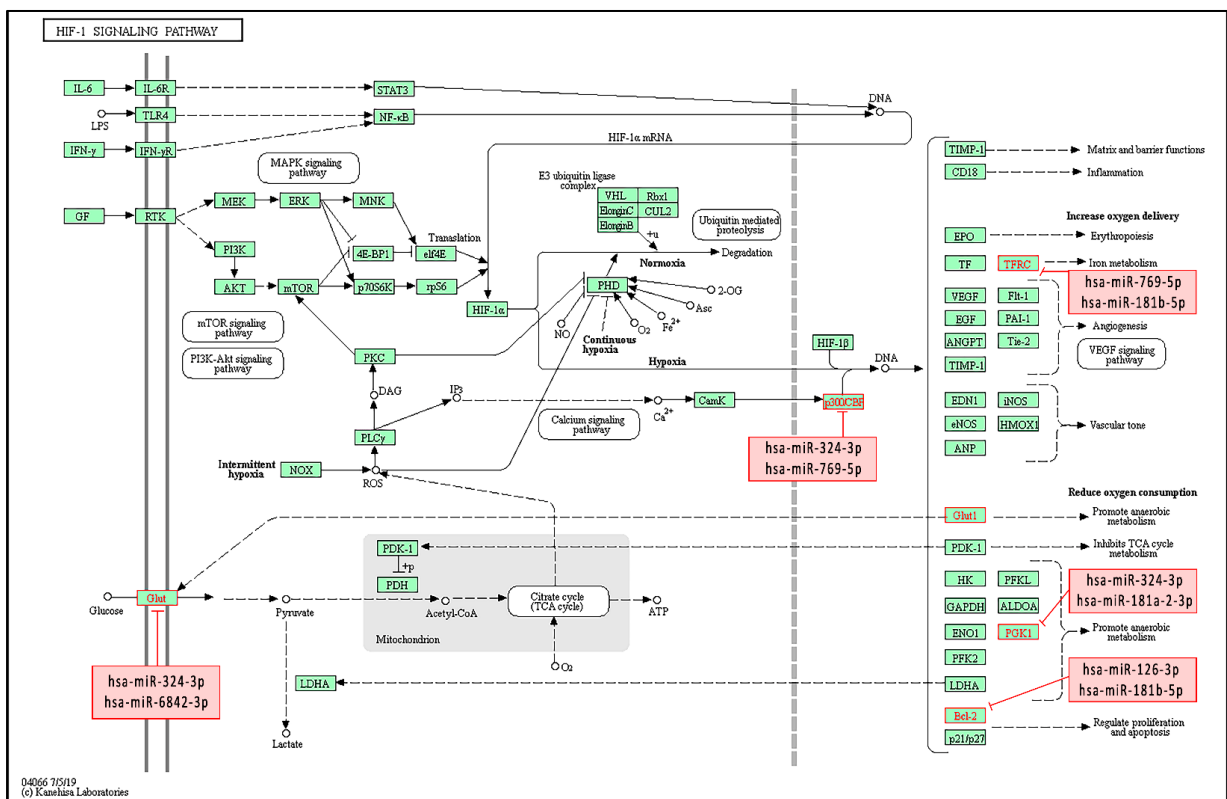


Figura 19 Via metabólica HIF-1 dos genes alvos dos mirnas expressamente identificados no grupo de pacientes acometidos com fissura lábio-palatino (FLP) não síndromicos.

O presente estudo sugere como hipótese que alteração na via HIF-1 (signaling pathway - Homo sapiens (human) https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04066/CREBBP/SLC2A1/PGK1/TFRC/BCL2) pode afetar o desenvolvimento das plataformas palatinas ao inibir a expressão de seu gene alvo. O fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1) é um fator de transcrição que funciona como um regulador mestre da homeostase do oxigênio. Eventualmente, o HIF-1 atua como um regulador mestre de vários genes indutíveis por hipóxia sob condições de hipóxia. Os genes alvo (*PGK1*, *BCL2*) do HIF-1 codificam proteínas que aumentam a distribuição de O₂ e medeiam as respostas adaptativas à privação de O₂. Apesar do nome, o HIF-1 é induzido não apenas em resposta à disponibilidade reduzida de oxigênio, mas também por outros estimulantes, como óxido nítrico ou vários fatores de crescimento

Outro estudo descobriu que *miR-200b* foi expresso no desenvolvimento de plataformas palatinas em camundongos e desempenhou um papel crucial na regulação de SMAD2 na apoptose durante a palatogênese, agindo como um regulador negativo direto (SOENO, 2006). Além disso, Shin et al, descobriram que a família ZEB pode estar envolvida na migração celular durante o desenvolvimento do palato e que níveis excessivos de *miR-200b* podem levar a costura de epitélio da borda medial não fundida (MES) através da inibição de ZEB1 e ZEB2 durante a palatogênese. Neste estudo, a expressão de miR-200b-3p foi regulada positivamente.

Os palatos primário e secundário têm diferentes fontes embrionárias; assim, as fissuras orofaciais são geralmente divididas em fissuras palatinas e ou fissuras lábio. Nosso estudo utilizou amostras de fissuras lábio palatinas exclusivamente, as mais comuns nas fissuras orais.

miRNAs formam redes regulatórias complexas e elaboradas dentro do transcriptoma e foi confirmado em diversos processos biológicos, incluindo a diferenciação de células-tronco embrionárias, o crescimento do mesencéfalo, metástases de câncer e outros. Neste estudo,

redes regulatórias miRNA pathway (Figura 19) foram construídas para explorar as potenciais associações regulatórias entre miRNAs em NSOC.

Neste estudo, a análise de enriquecimento das vias GO e KEGG foi usada para avaliar as funções biológicas e as vias dos genes alvo de miRNA. Por meio da análise de enriquecimento GO dos genes alvo, descobrimos que a função dos ncRNAs nos CL / P estava principalmente relacionada a comportamentos celulares, incluindo 'parte intracelular', 'ligação de molécula de adesão celular', 'parte citoplasmática', 'processo metabólico celular', 'localização celular' e outros. Essas funções celulares são coordenadas por numerosos genes que codificam vários fatores de crescimento, mediadores de sinalização, fatores de transcrição, citocinas e proteínas da matriz extracelular. Como é amplamente conhecido, vários eventos celulares e moleculares estão relacionados à palatogênese, incluindo apoptose, EMT, proliferação e migração celular, e qualquer perturbação desses programas pode causar NSOC. Portanto, é fundamental explorar genes e moléculas que regulam as biofunções acima mencionadas, a fim de compreender o comportamento celular durante a palatogênese (KANG, 2005).

A análise de enriquecimento KEGG revelou que as vias mais significativamente envolvidas na fissura foram '*viral carcinogenesis*', '*prostate cancer*', '*glucagon signaling pathway*', '*HIF-1 signaling pathway*', '*central carbon metabolism in cancer*', '*platinum drug resistance*', '*apoptosis- multiple species*.

A etiologia da NSOC é complexa e relacionada a múltiplos fatores, sugerindo que seu desenvolvimento possa envolver outros sistemas fisiológicos e processos biológicos. De acordo com uma pesquisa de acompanhamento de longo prazo, pacientes com fissura labiopalatina têm maior risco de câncer, doenças cardiovasculares, doenças do sistema nervoso central e até suicídio mais tarde na vida em comparação com indivíduos saudáveis, embora os mecanismos subjacentes não tenham sido estudados em profundidade (XIONG , 2019) Foi

hipotetizado que pacientes com fissura labiopalatina podem apresentar variações que não causam outras anormalidades ao nascimento, mas podem aumentar a suscetibilidade a outras doenças mais tarde na vida. Com base nos dados da análise deste estudo, não se pode excluir uma associação entre o risco de NSOC e os genes-alvo enriquecidos em outras funções e vias de sinalização.

Um total de 178 miRNAs foram expressos no grupo de portadores de Fissuras lábio palatais em comparação com o grupo controle. Três destes, apresentaram uma expressão significativa nas amostras coletadas dos portadores de fissuras orais não sindrômicas. Os miRNAs observados nesta pesquisa se mostraram presentes na regulação das vias HI e Apoptose, que são envolvidas no processo de palatogênese e adesão celular das prateleiras palatinas. Os miRNAs mais expressos foram *hsa-miR-181b-5p*, *hsa-miR-324-3p*, *hsa-miR-126-3p*, que participam nestas vias e atividades celulares.

Métodos de bioinformática *in silico* foram empregados para explorar as funções potenciais dos miRNAs e para construir redes regulatórias e seus genes alvos. Corroborando com estudos anteriores, como também recomenda se que o tamanho da amostra não seja inferior a 25, e quanto mais amostras houver, mais confiáveis serão os resultados. Neste estudo, em virtude do panorama mundial e diversas dificuldades oriundas desta pandemia, foram utilizados apenas nove (9) amostras para análise de RNA-Seq (2 controles, 7 CL /P).

Em relação a ancestralidade genômica verificamos influência dos marcadores de ancestralidade genômica de origem nativa americana e europeia, nesses pacientes, que corrobora outros resultados da literatura (VIEIRA- MACHADO, 2016), o que sugere que estas ancestralidades podem aumentar o risco no desenvolvimento das fissuras orais. Para essas análises foram utilizadas amostras de sangue periférico humano. O número de casos foi pequeno, portanto, mais experimentos de validação *in vitro* ou *in vivo* se fazem necessários para confirmar a hipótese.

As Fissuras Orais são rupturas graves que afetam as estruturas orofaciais e sociais. Pacientes com fissuras orofaciais requerem cuidados interdisciplinares complexos, que incluem enfermagem, cirurgia plástica, cirurgia maxilofacial, otorrinolaringologia, fonoaudiologia, aconselhamento psicológico e genético, ortodontia e tratamento odontológico, entre outros. De modo geral, o tratamento das fissuras labiais e palatinas representa um fardo econômico significativo para as famílias, para o indivíduo e a sociedade. Portanto, a prevenção é o objetivo final e isso será facilitado por um entendimento completo da etiologia dessa condição. Portanto, sugere-se revisar conceitos atuais sobre os fatores genéticos, epigenéticos e ambientais que contribuem para o surgimento das fissuras orofaciais, enfatizando os papéis dos componentes da via de sinalização no desenvolvimento normal e aberrante do lábio e palato.

CONCLUSÃO

Este estudo identificou, em uma população miscigenada da região norte do Brasil, 16 miRNAs diferencialmente expressos. Destes, nove miRNAs evidenciaram uma clara distinção de expressão entre os grupos controle e acometidos com fissura lábio palatina (*hsa-miR-181b-5p*, *hsa-miR-181a-3p*, *hsa-miR181a-2-3p*, *hsa-miR-660-5p*, *hsa-miR-126b-3p*, *hsa-miR-324-3p*, *hsa-miR-381-3p*, *hsa-miR-598-3p* e *hsa-miR-769-5p*). Dentre estes o *hsa-miR-660-5p* foi o único que corroborou a associação com FLP em estudos prévios, indicando que os outros oito miRNAs foram identificados pela primeira vez como potenciais novos biomarcadores ligados a fissura oral.

Em relação a avaliação da ancestralidade genômica observamos influência dos marcadores de ancestralidade genômica no grupo caso que apresentou maior contribuição nativa americana, enquanto o grupo controle possui uma maior contribuição europeia.

Métodos de bioinformática foram empregados para explorar as funções potenciais dos miRNAs e foi possível construir redes regulatórias e seus genes alvos.

Neste estudo, a análise de enriquecimento das vias GO e KEGG indicou que a função dos ncRNAs nos CL / P estava principalmente relacionada a comportamentos celulares, incluindo 'parte intracelular', 'ligação de molécula de adesão celular', 'parte citoplasmática', 'processo metabólico celular', 'localização celular' e outros. Foram identificados 94 genes alvos, dos quais foram utilizados para a análise de enriquecimento de vias. Estes genes demonstraram estar associados a duas vias que envolvidas na formação do palato, a via de sinalização da HIF-1 e da apoptose. Os miRNAs observados nesta pesquisa se mostraram presentes na regulação das vias HI e Apoptose, que são envolvidas no processo de palatogênese e adesão celular das prateleiras palatinas. O presente estudo levanta a hipótese

de que alteração na via HIF-1 e na via metabólica apoptose pode afetar o desenvolvimento das plataformas palatinas ao inibir a expressão de seu gene alvo. Os miRNAs mais expressos que participam nestas vias e atividades celulares foram *hsa-miR-181b-5p*, *hsa-miR-324-3p* e *hsa-miR-126-3p*.

Em resumo, o presente estudo pode propor um painel de miRNAs que apresentam um potencial aplicabilidade na rotina clínica, auxiliando no monitoramento do grupo de risco; além de identificar prováveis alvos epigenéticos para complementar a terapêutica. Contudo, mais estudos precisam ser desenvolvidos para confirmar os achados.

REFERÊNCIAS

MOSSEY PA, Modell B. Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. *Cleft lip and palate*. 2012, 16:1-8. doi: 10.1159/000337464

RIOS MOURA, Jamille, et al. Clinical-epidemiological profile of orofacial fissures in a reference center from northeast Brazil. *Revista de Salud Pública*, 2019, 21.2: 209-216. doi: 10.15446/rsap.V21n2.74065

LOFFREDO, Leonor de Castro Monteiro; FREITAS, José Alberto de Souza; GRIGOLLI, Ana A. Gomes. Prevalence of oral clefts from 1975 to 1994, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 2001, 35.6: 571-575. doi: 10.1590/S0034-89102001000600011

VIEIRA, Alexandre Rezende, et al. "Orofacial Clefts Frequency Differences Depending on Geographic Origin: Coast versus Inland." *Frontiers in Dental Medicine* 2 (2021): 14. doi: 10.3389/fdmed.2021.670948

CARLSON, Lucas; HATCHER, Kristin Ward; VANDER BURG, Richard. Elevated infant mortality rates among oral cleft and isolated oral cleft cases: a meta-analysis of studies from 1943 to 2010. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 2013, 50.1: 2-12. doi: 10.1597/11-087

PALANDI, Bianca Brito Novaes; GUEDES, Zelita Caldeira Ferreira. Aspectos da fala de indivíduos com fissura palatina e labial, corrigida em diferentes idades. *Revista CEFAC*, 2011, 13: 8-16. doi: 10.1590/S1516-18462011005000012

NOPOULOS, Peg, et al. Abnormal brain structure in children with isolated clefts of the lip or palate. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 2007, 161.8: 753-758. doi: 10.1001/archpedi.161.8.753

VAN DER PLAS, Ellen, et al. "Effects of unilateral clefts on brain structure." *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 164.8 (2010): 763-768. doi:10.1001/archpediatrics.2010.123

NOPOULOS, Peg, et al. "Structural brain abnormalities in adult males with clefts of the lip and/or palate." *Genetics in Medicine* 4.1 (2002): 1-9. Doi:10.1097/00125817-200201000-00001

WEINBERG, Seth M., et al. "Corpus callosum shape is altered in individuals with nonsyndromic cleft lip and palate." *American Journal of Medical Genetics Part A* 161.5 (2013): 1002-1007. doi: 10.1002/ajmg.a.35835.

MENG L, Bian Z, Torensma R and Von den Hoff JW (2009) Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J Dent Res.* v. 88, p. 22 - 33. doi:10.1177/0022034508327868

ZIEGLER, U., and P. Groscurth. "Morphological features of cell death." *Physiology* 19, no. 3 (2004): 124-128. doi:10.1152/nips.01519.2004

SEELAN, Ratnam S., Partha Mukhopadhyay, M. Michele Pisano, and Robert M. Greene. "Developmental epigenetics of the murine secondary palate." *ILAR journal* 53, no. 3-4 (2012): 240-252. doi:10.1093/ilar.53.3-4.240

VIEIRA, Alexandre R. "Genetic and environmental factors in human cleft lip and palate." *Cleft Lip and Palate* 16 (2012): 19-31. doi: 10.1159/000337521

LEAL, Fernanda, A. R. B. Lemos, G. F. Costa, and Inês Lopes Cardoso. "Genetic and environmental factors involved in the development of oral malformations such as cleft lip/palate in non-syndromic patients and open bite malocclusion." *European Journal of Medical and Health Sciences* 2, no. 3 (2020): 1-11. doi: 10.24018/ejmed.2020.2.3.262 <http://hdl.handle.net/10284/8990>

DE ARAUJO, Tânia Kawasaki, Rodrigo Secolin, Têmis Maria Félix, Liliane Todeschini de Souza, Marshall Ítalo Barros Fontes, Isabella Lopes Monlleó, Josiane de Souza et al. "A multicentric association study between 39 genes and nonsyndromic cleft lip and palate in a Brazilian population." *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 44, no. 1 (2016): 16-20. doi:10.1016/j.jcms.2015.07.026

DIXON, Michael J., Mary L. Marazita, Terri H. Beaty, and Jeffrey C. Murray. "Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences." *Nature Reviews Genetics* 12, no. 3 (2011): 167-178. doi: 10.1038/nrg2933

MERRITT, L. "Understanding the embryology and genetics of cleft lip and palate." *Advances in neonatal care* 5, no. 2 (2005): 64-71. doi: 10.1016/j.adnc.2004.12.006

MARTINELLI, Marcella, Annalisa Palmieri, Francesco Carinci, and Luca Scapoli. "Non-syndromic cleft palate: an overview on human genetic and environmental risk factors." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (2020): 1155. doi: 10.3389/fcell.2020.592271

BEZERRA, João Felipe, Heglayne Pereira Vital da Silva, Raul Hernandes Bortolin, André Ducati Luchessi, Marcela Abbott Galvão Ururahy, Melina Bezerra Loureiro, Vera Lúcia Gil-da-Silva-Lopes, Maria das Graças Almeida, Viviane Souza do Amaral, and Adriana Augusto de Rezende. "IRF6 polymorphisms in Brazilian patients with non-syndromic cleft lip with or without palate." *Brazilian journal of otorhinolaryngology* 86 (2020): 696-702. doi: 10.1016/j.bjorl.2019.04.011

BEATY, Terri H., Ingo Ruczinski, Jeffrey C. Murray, Mary L. Marazita, Ronald G. Munger, Jacqueline B. Hetmanski, Tanda Murray et al. "Evidence for gene-environment interaction in a genome wide study of nonsyndromic cleft palate." *Genetic epidemiology* 35, no. 6 (2011): 469-478. doi: 10.1002/gepi.20595

BÖHMER, Anne C., Elisabeth Mangold, Peter Tessmann, Peter A. Mossey, Regine P. Steegers-Theunissen, Jan Lindemans, Marieke Bouwman-Both et al. "Analysis of susceptibility loci for nonsyndromic orofacial clefting in a European trio sample." *American Journal of Medical Genetics Part A* 161, no. 10 (2013): 2545-2549. doi: 10.1002/ajmg.a.36141

BUTALI, Azeez, Peter A. Mossey, Wasiu L. Adeyemo, Mekonen A. Eshete, Lord JJ Gowans, Tamara D. Busch, Deepti Jain et al. "Genomic analyses in African populations identify novel risk loci for cleft palate." *Human molecular genetics* 28, no. 6 (2019): 1038-1051. doi: 10.1093/hmg/ddy402

IWATA JI, Parada C, Chai Y. The mechanism of TGF- β signaling during palate development. *Oral diseases*. 2011 Nov;17(8):733-44. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01806.x

MACHADO, Renato Assis. Associação dos polimorfismos nos genes HOXD1, TNP1, MSX1, TCOF1, FGFR1, COL2A1, WNT3 e TIMP3 com fissuras de lábio e/ou palato não-sindrômica em uma população brasileira. 2015. 76 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, SP. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/288736>

SINGH D, Bastian TS, Kudva S, Singh MK, Sharma P. Classification Systems for Orofacial Clefts. *Oral & Maxillofacial Pathology Journal*. 2015 Jan 1;6(1).doi: 10.5005/jp-journals-10037-1035

SPINA V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classificação das fissuras lábio-palatinas: sugestão de modificação. *Rev Hosp Fac Med São Paulo*. 1972; 27(1): 5-6.

SILVA FILHO, O G; FERRARI JUNIOR, F M; ROCHA, Diógenes Laércio; FREITAS, J A S. Classificação das fissuras labio-palatais: breve histórico, considerações clínicas e sugestão de modificação. *Revista Brasileira de Cirurgia*, Rio de Janeiro, v. 82, n. 2 , p. 59-65, 1992.

CYMROT M, Sales FD, Teixeira FD, Teixeira Junior FD, Teixeira GS, Cunha Filho JF, Oliveira ND. Prevalência dos tipos de fissura em pacientes com fissuras labiopalatinas atendidos em um Hospital Pediátrico do Nordeste brasileiro. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*. 2010;25:648-51. doi: 10.1590/S1983-51752010000400015.

LEWIS CW, Jacob LS, Lehmann CU. The primary care pediatrician and the care of children with cleft lip and/or cleft palate. *Pediatrics*. 2017 May 1;139(5). PMID: 3262457

YOW M, Jin A, Yeo GS. Epidemiologic trends of infants with orofacial clefts in a multiethnic country: a retrospective population-based study. *Scientific Reports*. 2021 Apr 6;11(1):1-8. doi: 10.1038/s41598-021-87229-4

PETER AM, Julian L, Ron GM. Cleft lip and palate. *Lancet*. 2009;374:1773-85. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60695-4

STUPPIA L, Capogreco M, Marzo G, La Rovere D, Antonucci I, Gatta V, Palka G, Mortellaro C, Tetè S. Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2011 Sep 1;22(5):1722-6. doi: 10.1097/SCS.0b013e31822e5e4d

KAWALEC A, Nelke K, Pawlas K, Gerber H. Risk factors involved in orofacial cleft predisposition—review. *Open Medicine*. 2015 Feb 5;10(1).doi: 10.1515/med-2015-0027),

LEITE IC, Koifman S. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian oral research*. 2009 Mar;23(1):31-7. doi: 10.1590/S1806-83242009000100006

JOHNSON CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging?. *International journal of epidemiology*. 2008 Oct 1;37(5):1041-58. doi:10.1093/ije/dyn098

JIMÉNEZ-FARFÁN D, Guevara J, Zenteno E, Hernández-Guerrero JC. Alteration of the sialylation pattern of the murine tooth germ after ethanol exposure. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2005 Dec;73(12):980-8. doi: 10.1002/bdra.20195

SHAW GM, Nelson V, Iovannisci DM, Finnell RH, Lammer EJ. Maternal occupational chemical exposures and biotransformation genotypes as risk factors for selected congenital anomalies. *American journal of epidemiology*. 2003 Mar 15;157(6):475-84. doi: 10.1093/aje/kwg013

GORDON JE, Shy CM. Agricultural chemical use and congenital cleft lip and/or palate. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1981 Sep 1;36(5):213-21. doi: 10.1080/00039896.1981.10667627

SILVA CM, de Moraes Pereira MC, de Queiroz TB, das Neves LT. Can parental consanguinity be a risk factor for the occurrence of nonsyndromic oral cleft?. *Early human development*. 2019 Aug 1;135:23-6. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2019.06.005

DeRoo LA, Gaudino JA, Edmonds LD. Orofacial cleft malformations: associations with maternal and infant characteristics in Washington State. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2003 Sep;67(9):637-42. doi: 10.1002/bdra.10114

VIEIRA AR, Orioli IM, Murray JC. Maternal age and oral clefts: a reappraisal. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2002 Nov 1;94(5):530-. doi: 10.1067/moe.2002.128875

DIXON MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews Genetics*. 2011 Mar;12(3):167-78.

De AQUINO SN, Messetti AC, Hoshi R, Borges A, Viena CS, Reis SR, Oliveira Swerts MS, Graner E, Martelli-Júnior H, Coletta RD. Analysis of susceptibility polymorphisms for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2014 Jan;100(1):36-42. doi: 10.1002/bdra.23204

CARSTENS MH. Development of the facial midline. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2002 Jan 1;13(1):129-87. doi: 10.1097/00001665-200201000-00032

LAN Y, Xu J, Jiang R. Cellular and molecular mechanisms of palatogenesis. *Current topics in developmental biology*. 2015 Jan 1;115:59-84. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.002

MENG L, Bian Z, Torensma R, Von den Hoff JW. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *Journal of dental research*. 2009 Jan;88(1):22-33. doi: 10.1177/0022034508327868

DUPONT C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. In *Seminars in reproductive medicine* 2009 Sep (Vol. 27, No. 05, pp. 351-357). © Thieme Medical Publishers. doi: 10.1055/s-0029-1237423

ZHANG, H., Sun, Y., Li, J., Huang, L., Tan, S., Yang, F., & Li, H. (2017). The expression of microRNA-324-3p as a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance. *OncoTargets and Therapy*, Volume 10, 4935–4943. doi: 10.2147/OTT.S144223

MATTICK JS. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep.* 2001;2(11):986-991. doi:10.1093/embo-reports/kve230

LATOWSKA, J.; Grabowska, A.; Zarębska, Ż.; Kuczyński, K.; Kuczyńska, B.; Rolle, K. Non-Coding RNAs in Brain Tumors, the Contribution of lncRNAs, circRNAs, and snoRNAs to Cancer Development—Their Diagnostic and Therapeutic Potential. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 7001. <https://doi.org/10.3390/ijms21197001>

ANASTASIADOU E, JACOB LS, SLACK FJ. Non-coding RNA networks in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(1):5-18. doi:10.1038/nrc.2017.99

RIBEIRO-DOS-SANTOS, A MAURÍCIO, AC AND SYLVAIN DARNET. “Deep Sequencing of MicroRNAs in Cancer: Expression Profiling and Its Applications.” (2012). DOI:10.1007/978-3-642-22517-8_21. Corpus ID: 83155276

MATSUYAMA H; SUZUKI H. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(1), 132; <https://doi.org/10.3390/ijms21010132>

KROL, J., LOEDIGE, I. & FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597–610 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrg2843>

VERA E, BERNARDES DE JESUS B, FORONDA M, FLORES JM, BLASCO MA. Telomerase reverse transcriptase synergizes with calorie restriction to increase health span and extend mouse longevity. *PLoS One.* 2013;8(1):e53760. doi:10.1371/journal.pone.0053760

GROSS N, Kropp J, Khatib H. MicroRNA signaling in embryo development. *Biology.* 2017 Sep;6(3):34. doi: 10.3390/biology6030034

WATERLAND RA, Michels KB. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu. Rev. Nutr.* 2007 Aug 21;27:363-88. DOI: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093705

INBAR-FEIGENBERG M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. Basic concepts of epigenetics. *Fertility and sterility*. 2013 Mar 1;99(3):607-15. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.117

SUZUKI A, Abdallah N, Gajera M, Jun G, Jia P, Zhao Z and Iwata J: Genes and microRNAs associated with mouse cleft palate: A systematic review and bioinformatics analysis. *Mech Dev* 150: 21–27, 2018.

SCHOEN C, Glennon JC, Abghari S, Bloemen M, Aschrafi A, Carels CEL and Von den Hoff JW: Differential microRNA expression in cultured palatal fibroblasts from infants with cleft palate and controls. *Eur J Orthod* 40: 90–96, 2018. doi: 10.1093/ejo/cjx034

RADHAKRISHNA U: Small players with a big role: MicroRNAs in pathophysiology of cleft lip and palate. *Indian J Hum Genet* 18: 272–3, 2012.

WANG S, Sun C, Meng Y, Zhang B, Wang X, Su Y, Shi L, Zhao E. A pilot study: screening target miRNAs in tissue of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017 May 1;13(5):2570-6. doi:10.3892/etm.2017.4248

LI J, Zou J, Li Q, Chen L, Gao Y, Yan H, Zhou B, Li J. Assessment of differentially expressed plasma microRNAs in nonsyndromic cleft palate and nonsyndromic cleft lip with cleft palate. *Oncotarget*. 2016 Dec 27;7(52):86266./// doi: 10.18632/oncotarget.13379

ZOU J, Li J, Li J, Ji C, Li Q and Guo X: Expression profile of plasma microRNAs in nonsyndromic cleft lip and their clinical significance as biomarkers. *Biomed Pharmacother* 82: 459–66, 2016. doi: 10.1016/j.biopha.2016.05.033

TURCHINOVICH A, Weiz L and Burwinkel B: Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci* 37: 460–5, 2012.

CHENG G: Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 81: 75–93, 2015.

KHO AT, McGeachie MJ, Moore KG, Sylvia JM, Weiss ST and Tantisira KG: Circulating microRNAs and prediction of asthma exacerbation in childhood asthma. *Respir Res* 19: 128, 2018.

CAMMARATA G, Scalia S, Colomba P, Zizzo C, Pisani A, Riccio E, Montalbano M, Alessandro R, Giordano A, et al.: A pilot study of circulating microRNAs as potential biomarkers of Fabry disease. *Oncotarget* 9: 27333–27345, 2018.

MENDES SM, Espinosa DD, Moreira PE, Marques D, Fagundes NC, Ribeiro-dos-Santos Â. miRNAs as biomarkers of orofacial clefts: A systematic review. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2020 Mar;49(3):201-9. doi: 10.1111/jop.12950

RIBEIRO-DOS-SANTOS Â, Khayat AS, Silva A, Alencar DO, Lobato J, Luz L, Pinheiro DG, Varuzza L, Assumpção M, Assumpção P, Santos S. Ultra-deep sequencing reveals the microRNA expression pattern of the human stomach. *PloS one*. 2010 Oct 8;5(10):e13205.doi: 10.1371/journal.pone.0013205

GOMES LL, Moreira FC, Hamoy IG, Santos S, Assumpção P, Santana ÂL, Ribeiro-dos-Santos Â. Identification of miRNAs expression profile in gastric cancer using self-organizing maps (SOM). *Bioinformatics*. 2014;10(5):246.doi: 10.6026/97320630010246

MOREIRA FC, Assumpção M, Hamoy IG, Darnet S, Burbano R, Khayat A, Gonçalves AN, Alencar DO, Cruz A, Magalhaes L, Araujo Jr W. MiRNA expression profile for the human gastric antrum region using ultra-deep sequencing. *PLoS One*. 2014 Mar 19;9(3):e92300. doi:10.1371/journal.pone.0092300

ASSUMPÇÃO MB, Moreira FC, Hamoy IG, Magalhães L, Vidal A, Pereira A, Burbano R, Khayat A, Silva A, Santos S, Demachki S. High-throughput miRNA sequencing reveals a field effect in gastric cancer and suggests an epigenetic network mechanism. *Bioinformatics and Biology insights*. 2015 Jan;9:BBI-S24066. doi:10.4137/BBI.S24066

DARNET S, Moreira FC, Hamoy IG, Burbano R, Khayat A, Cruz A, Magalhães L, Silva A, Santos S, Demachki S, Assumpção M. High-throughput sequencing of miRNAs reveals a tissue signature in gastric cancer and suggests novel potential biomarkers. *Bioinformatics and biology insights*. 2015 Jan;9:BBI-S23773. doi: 10.4137/BBI.S23773

VIDAL AF, Cruz AM, Magalhães L, Pereira AL, Anaissi AK, Alves NC, Albuquerque PJ, Burbano RM, Demachki S, Ribeiro-dos-Santos Â. hsa-miR-29c and hsa-miR-135b differential expression as potential biomarker of gastric carcinogenesis. *World journal of gastroenterology*. 2016 Feb 14;22(6):2060. Doi: 10.3748/wjg.v22.i6.2060

MAGALHÃES L, Quintana LG, Lopes DC, Vidal AF, Pereira AL, Pinto LC, Pinheiro JD, Khayat AS, Goulart LR, Burbano R, de Assumpção PP. APC gene is modulated by hsa-miR-135b-5p in both diffuse and intestinal gastric cancer subtypes. *BMC cancer*. 2018 Dec;18(1):1-0. Doi:10.1186/s12885-018-4980-7

LOPES CB, Magalhães LL, Teófilo CR, Alves AP, Montenegro RC, Negrini M, Ribeiro-dos-Santos Â. Differential expression of hsa-miR-221, hsa-miR-21, hsa-miR-135b, and hsa-miR-29c suggests a field effect in oral cancer. *BMC cancer*. 2018 Dec;18(1):1-0. doi: 10.1186/s12885-018-4631-z.

DE PAIVA Lopes K, Vinasco-Sandoval T, Vialle RA, Paschoal FM, Bastos VA, Bor-Seng-Shu E, Teixeira MJ, Yamada ES, Pinto P, Vidal AF, Ribeiro-dos-Santos A. Global miRNA expression profile reveals novel molecular players in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Scientific reports*. 2018 Jun 8;8(1):1-1. doi: 10.1038/s41598-018-27078-w

SALGADO CG, Pinto P, BOUTH RC, Gobbo AR, Messias AC, Sandoval TV, Dos Santos AM, Moreira FC, Vidal AF, Goulart LR, Barreto JG. miRNome expression analysis reveals new players on leprosy immune physiopathology. *Frontiers in immunology*. 2018 Mar 9;9:463.doi: 10.3389/fimmu.2018.00463

MARQUES D, et al. Role of miRNAs in Sigmoid Colon Cancer: A Search for Potential Biomarkers. *Cancers*. 2020 Nov;12(11):3311.doi: 10.3390/cancers12113311

BALARESQUE P L., BALLEREAU S J. JOBLING M A., Challenges in human genetic diversity: demographic history and adaptation, *Human Molecular Genetics*, Volume 16, Issue R2, 15 October 2007, Pages R134–R139, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm242>

PENA SDJ, et al. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. *PLOS ONE* (2011) 6(2): e17063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017063>

SANTOS NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos ÂK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48–insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Human mutation*. 2010 Feb;31(2):184-90. doi: 10.1002/humu.21159

ANDRADE RB, Amador MA, Cavalcante GC, Leitão LP, Fernandes MR, Modesto AA, Moreira FC, Khayat AS, Assumpção PP, Ribeiro-dos-Santos Â, Santos S. Estimating Asian contribution to the Brazilian population: a new application of a validated set of 61 ancestry informative markers. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2018 Nov 1;8(11):3577-82.doi: doi: 10.1534/g3.118.200650).

COLLINS-SCHRAMM, H.E., et al. Markers that discriminate between European and African ancestry show limited variation within Africa. *Hum Genet* 111, 566–569 (2002). <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0818-z>

DE AQUINO, S. N., et al Analysis of susceptibility polymorphisms for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, . (2014). 100(1), 36–42. doi:10.1002/bdra.23204

VIEIRA-MACHADO, et al. Analysis of the genetic ancestry of patients with oral clefts from South American admixed populations. *European journal of oral sciences* 124, no. 4 (2016): 406-411. doi.org/10.1111/eos.12275

BENEDET A.L. ET . Amerindian Genetic Ancestry Protects against Alzheimer’s Disease.*Dement Geriatr Cogn Disord* 2012, Vol.33, No. 5 <https://doi.org/10.1159/000339672>

PARRA F C. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Jan 2003, 100 (1) 177-182; DOI: 10.1073/pnas.0126614100

PARRA E.J. et al. Control of Confounding of Genetic Associations in Stratified Populations. *The American Journal of Human Genetics*. Volume 72, Issue 6, June 2003, Pages 1492-1504.

ANDRADE R.B. et al. Estimating Asian Contribution to the Brazilian Population: A New Application of a Validated Set of 61 Ancestry Informative Markers. *G3-Genes Genomes Genetics*, v. 8, p. 3577-3582, 2018.

RAMOS B.R.A. et al. Ancestry informative markers and selected single nucleotide polymorphisms in immunoregulatory genes on preterm labor and preterm premature rupture of membranes: a case control study. *BMC Pregnancy and Childbirth (Online)*, v. 16, p. PMC4743423, 2016.

RAMOS B.R.A. et al. Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. *Genetica ('s-Gravenhage)*, v. 3, p. 001, 2016.

CARDENA, M.M.S.G. et al. Amerindian genetic ancestry is associated with higher survival rates compared to African and European ancestry in Brazilian patients with heart failure. *International Journal of Cardiology (Print)*, v. 176, p. 527-528, 2014.

LOPES TR. et al. Population data of the 46 insertion-deletion (INDEL) loci in population in Piauí State, Northeastern Brazil. *Forensic Science International. Genetics (Print)*, v. 1030, p. 1-3, 2013.

OTA V.K. et al. Candidate genes for schizophrenia in a mixed Brazilian population using pooled DNA. *Psychiatry Research (Print)*, p. S0165-1781(12), 2013.

ALVIZI, L., et. Differential methylation is associated with non-syndromic cleft lip and palate and contributes to penetrance effects. *Scientific Reports*, 2017. 7(1). doi:10.1038/s41598-017-02721-0

YANG, C., Tabatabaei, S. N., Ruan, X., & Hardy, P. (2017). The Dual Regulatory Role of MiR-181a in Breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(3), 843–856. doi: 10.1159/000485351

INDRIERI, A., Carrella, S., Carotenuto, P., Banfi, S., & Franco, B. (2020). The Pervasive Role of the miR-181 Family in Development, Neurodegeneration, and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2092. doi:10.3390/ijms21062092

IWATA, J., Parada, C., & Chai, Y. (2011). The mechanism of TGF- β signaling during palate development. *Oral Diseases*, 17(8), 733–744. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01806.x

CARRELLA, S., D'Agostino, Y., Barbato, S., Huber-Reggi, S. P., Salierno, F. G., Manfredi, A., ... Conte, I. (2015). miR-181a/b control the assembly of visual circuitry by regulating retinal axon specification and growth. *Developmental Neurobiology*, 75(11), 1252–1267. doi:10.1002/dneu.22282).

VALASSI E, García-Giralt N, Malouf J, Crespo I, Llauger J, Díez-Pérez A, Webb SM. Circulating miR-103a-3p and miR-660-5p are associated with bone parameters in patients with controlled acromegaly. *Endocrine connections*. 2019 Jan 1;8(1):39-49. doi:10.1530/EC-18-0482

HE, T., Chen, P., Jin, L., Hu, J., Li, Y., Zhou, L., ... Lai, Y. (2017). miR 660 5p is associated with cell migration, invasion, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*. doi: 10.3892/mmr.2017.8052

PENG B, Li C, He L, Tian M, Li X. miR-660-5p promotes breast cancer progression through down-regulating TET2 and activating PI3K/AKT/mTOR signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2020 Oct 30;53. doi: 10.1590/1414-431X20209740

YU, J. S. L., & Cui, W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*, (2016). 143(17), 3050–3060. doi:d10.1242/dev.137075

SHI, L., Li, B., Zhang, B., Zhen, C., Zhou, J., & Tang, S. Mouse embryonic palatal mesenchymal cells maintain stemness through the PTEN-Akt-mTOR autophagic pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, (2019). 10(1). doi:10.1186/s13287-019-1340-8

NIKOLIC, I., Plate, K.-H., & Schmidt, M. H. (2010). EGFL7 meets miRNA-126: an angiogenesis alliance. *Journal of Angiogenesis Research*, 2(1), 9. doi:10.1186/2040-2384-2-9

WU XJ, Zhao ZF, Kang XJ, Wang HJ, Zhao J, Pu XM. MicroRNA-126-3p suppresses cell proliferation by targeting PIK3R2 in Kaposi's sarcoma cells. *Oncotarget*. 2016 Jun 14;7(24):36614. doi: 10.18632/oncotarget.9311

ICHIKAWA R, Kawasaki R, Iwata A, Otani S, Nishio E, Nomura H, Fujii T. MicroRNA 126 3p suppresses HeLa cell proliferation, migration and invasion, and increases apoptosis via the PI3K/PDK1/AKT pathway. *Oncology reports*. 2020 Apr 1;43(4):1300-8. doi: 10.3892/or.2020.7512

KANG, P., & Svoboda, K. K. H. Epithelial-Mesenchymal Transformation during Craniofacial Development. *Journal of Dental Research*, (2005). 84(8), 678–690. doi:10.1177/154405910508400801).

KIM, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G. D., Kosik, K. S., Church, G. M., & Ruvkun, G. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2003). 101(1), 360–365. doi: 10.1073/pnas.2333854100

ZHANG HQ, Sun Y, Li JQ, et al. The expression of microRNA-324-3p as a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance. *Onco Targets Ther*. 2017;10:4935-4943. Published 2017 Oct 11. doi:10.2147/OTT.S144223

LIU, C., Li, G., Yang, N., Su, Z., Zhang, S., Deng, T., ... Qiu, Y. miR-324-3p suppresses migration and invasion by targeting WNT2B in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell International*, (2017). 17(1). doi: 10.1186/s12935-016-0372-8

XU, Y., et al. Changes in the Expression of miR-381 and miR-495 Are Inversely Associated with the Expression of the MDR1 Gene and Development of Multi-Drug Resistance. *PLoS ONE*, (2013). 8(11), e82062. Doi:10.1371/journal.pone.0082062

ZHAO, C. et al. MicroRNA-381-3p Functions as a Dual Suppressor of Apoptosis and Necroptosis and Promotes Proliferation of Renal Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, (2020). 8. doi: 10.3389/fcell.2020.00290.

SOENO, Y., Taya, Y., & Aoba, T. Fate of Medial Edge Epithelium in Mouse Palatogenesis in vitro : Apoptosis, Migration, and Epithelial-mesenchymal Transformation. *Journal of Oral Biosciences*, (2006). 48(4), 286–296. doi: 10.1016/S1349-0079(06)80011-3

YANG, F., Wei, K., Qin, Z., Liu, W., Shao, C., Wang, C., ... Shen, H. MiR-598 Suppresses Invasion and Migration by Negative Regulation of Derlin-1 and Epithelial-Mesenchymal Transition in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, (2018). 47(1), 245–256. doi: 10.1159/000489803

MA, Y., Yan, F., Wei, W., Deng, J., Li, L., Liu, L., & Sun, J. MicroRNA-598 inhibits the growth and maintenance of gastric cancer stem-like cells by down-regulating RRS1. *Cell Cycle*, (2019). 1–13. doi: 10.1080/15384101.2019.1657338

CASEY, L. M., Lan, Y., Cho, E.-S., Maltby, K. M., Gridley, T., & Jiang, R. Jag2-Notch1 signaling regulates oral epithelial differentiation and palate development. *Developmental Dynamics*, (2006). 235(7), 1830–1844. doi: 10.1002/dvdy.20821

LUAN PB, Jia XZ, Yao J. MiR-769-5p functions as an oncogene by down-regulating RYBP expression in gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Jun 1;24(12):6699-706. doi: 10.26355/eurrev_202006_21657

YANG Z, He J, Gao P, Niu Y, Zhang J, Wang L, Liu M, Wei X, Liu C, Zhang C, Wang W. miR-769-5p suppressed cell proliferation, migration and invasion by targeting TGFBR1 in non-small cell lung carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Dec 26;8(69):113558. doi:10.18632/oncotarget.23060

KÜCHLER, E. C., Silva, L. A. da, Nelson-Filho, P., Sabóia, T. M., Rentschler, A. M., Granjeiro, J. M., ... Vieira, A. R. Assessing the association between hypoxia during craniofacial development and oral clefts. *Journal of Applied Oral Science*, (2018). 26(0). doi:10.1590/1678-7757-2017-0234

LIU, J., Chanumolu, S. K., White, K. M., Albahrani, M., Otu, H. H., & Nawshad, A. (2020). Transcriptional analysis of cleft palate in TGF β 3 mutant mice. *Scientific Reports*, 10(1). Doi: 10.1038/s41598-020-71636-0

SALEEM K, Zaib T, Sun W, Fu S. Assessment of candidate genes and genetic heterogeneity in human non syndromic orofacial clefts specifically non syndromic cleft lip with or without palate. *Heliyon*. 2019 Dec 1;5(12):e03019. Doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e03019

YAN F, Dai Y, Iwata J, Zhao Z, Jia P. An integrative, genomic, transcriptomic and network-assisted study to identify genes associated with human cleft lip with or without cleft palate. *BMC medical genomics*. 2020 Apr;13(5):1-3.10.1186/s12920-020-0675-4

INDENCLEEF K, Roosenboom J, Hoskens H, White JD, Shriver MD, Richmond S, Peeters H, Feingold E, Marazita ML, Shaffer JR, Weinberg SM. Six NSCL/P loci show associations with normal-range craniofacial variation. *Frontiers in genetics*. 2018 Oct 25;9:502. DOI:10.1093/HMG/DDU489

LI H, Jones KL, Hooper JE, Williams T. The molecular anatomy of mammalian upper lip and primary palate fusion at single cell resolution. *Development*. 2019 Jun 15;146(12):dev174888. DOI: 10.1242/dev.174888

XIONG Z et al. Novel genetic loci affecting facial shape variation in humans. *Research Article* Nov 25, 2019. Cite as: *eLife* 2019;8:e49898 DOI: 10.7554/eLife.49898

ANEXOS

Anexo 1**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA ANÁLISE DE DADOS**

Eu Profa. Dra. **ANDREA KELY RIBEIRO DOS SANTOS** Coordenadora do Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA, Professora Orientadora no programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em nível de Doutorado, da Universidade Federal do Pará, venho por meio desta autorizar **SISSY MARIA DOS ANJOS MENDES**, matriculada sob o número 2016112480010, aluna do Curso de Doutorado para **ANÁLISE DE DADOS** das coletas de sua pesquisa nessa instituição, com a finalidade de realizar a pesquisa de Tese de Doutorado intitulada: **miRNAs no mecanismo das Fissuras Orais Não-Sindrômicas**. Com objetivo geral de identificar o perfil de expressão global dos microRNAs em amostras de pacientes com fissura oral não sindrômica e seus controles sem fissura, da região norte do Brasil, para obter uma melhor compreensão dos mecanismos que levam à ocorrência destas malformações de fissuras orais e contribuir para o estabelecimento de medidas preventivas das mesmas.

A análise de dados ocorrerá mediante as amostras coletadas de material biológico (sangue periférico) dos indivíduos selecionados, utilizando tubo *Tempus Blood RNA* (Thermo fisher Scietnific, US) e estocados em temperatura de -20° C até a extração. Todos os indivíduos com fissuras orais não sindrômicas e controle sem fissuras, possuirão entre dois e 12 meses de idade (período recomendado para primeira cirurgia corretiva da fissura oral). Coleta sangue do cordão umbilical de indivíduos com fissuras orais não sindrômicas e controle sem fissuras ao nascimento, utilizando tubo *Tempus Blood RNA* (Thermo fisher Scietnific, US) e estocados em temperatura de -20° C até a extração do RNA, amostra de tecido da área fissurada, amazeandos em scope com Rna later, oriundos do Hospital Santa Casa do Pará. O Laboratório GHM da UFPA, assume o compromisso de utilizar os dados obtidos somente para fins científicos, bem como de disponibilizar os resultados obtidos para esta instituição ao final do projeto.

Belém, _____

ÂNDREA KELY RIBEIRO DOS SANTOS

Coordenadora do Laboratório de Genética Humana e Médica da UFPA

Professora Orientadora do programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Anexo 2**TERMO DE ESCLARECIMENTO SERVIDOR SANTA CASA E AUTORIZAÇÃO
PARA EFETUAR COLETA DE AMOSTRA**

Ilmo. Sr. _____
Diretoria Administrativa e Financeira Santa Casa do Pará.

Eu, **Servidor da Santa Casa** _____, matriculada sob o número _____, fui informado da forma detalhada da forma de coleta e armazenamento das amostras nesta instituição, para a pesquisa de Doutorado intitulada: **miRNAs no mecanismo das Fissuras Orais Não-Sindrômicas, da aluna Sissy Maria dos Anjos Mendes**, matriculada sob o número 2016112480010 no programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em nível de Doutorado, da Universidade Federal do Pará, sob a orientação da professora Dra. Ândrea Kely Ribeiro dos Santos.

O objetivo geral será identificar o perfil de expressão global dos microRNAs em amostras de pacientes com fissura oral não sindrômica e seus controles sem fissura, da região norte do Brasil, para obter uma melhor compreensão dos mecanismos que levam à ocorrência destas malformações de fissuras orais e contribuir para o estabelecimento de medidas preventivas das mesmas.

A coleta de dados ocorrerá mediante amostras de material biológico (1ml de sangue periférico descartado da venólise do ato cirurgico) dos indivíduos selecionados, utilizando tubo *Tempus Blood RNA* (Thermo fisher Scietnific, US) e estocados em temperatura de -20° C em recipiente trmico cedido pelo pesquisador). Todos os indivíduos com fissuras orais não sindromicas e controle sem fissuras, possuirão entre dois e 12 meses de idade (período recomendado para primeira cirurgia corretiva da fissura oral). Coleta sangue do cordão umbilical descartado do exame de tipagem sanuinea dos recém nascido nestea instituição de indivíduos com fissuras orais não sindromicas e controle sem fissuras ao nascimento, utilizando tubo *Tempus Blood RNA* (Thermo fisher Scietnific, US)

Coleta de amostra de 1 ng de tecido descartado da área fissurada durante a cirurgia corretiva da fissura, amarzeandos em scope com Rna later, cedidos pelo pesquisador, todas a s amostras deverão ser estocados em temperatura de -20° C até a extração do RNA,

Igualmente, assumo o compromisso de avisar o pesquisador para resgate do material coletado obtidos somente para fins científicos

Belém, _____

Servidor Santa Casa - Matricula

Anexo 3.**PROTÓCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA DE AMOSTRAS CONSERVADAS EM TRIZOL**

1. Pré-ajustar a microcentrífuga refrigerada para que se obtenha a temperatura de 4°C.
2. Transferir toda a solução conservante para um tubo de 1.5 mL, tomando o cuidado de não transferir pedaços do órgão ou o pellet de células.
3. Adicionar 0.2mL de clorofórmio para cada 1mL de TriZOL que foi transferido para o tubo. Vortexar vigorosamente até obter uma solução rósea de aspecto leitoso.
4. Centrifugar a 13.000g a 4°C por 15 minutos.
5. Observar as 3 fases da solução: a primeira, aquosa, contém o RNA; a interfase branca e leitosa contém principalmente DNA e a fase inferior rósea contém predominantemente proteínas. Separar a fase aquosa para um novo tubo de 1.5 mL.
6. Adicionar a cada tubo isopropanol, na mesma quantidade de solução obtida.
7. Vortexar vigorosamente e incubar por 15 minutos a -20°C. Neste ponto, o procedimento pode ser interrompido por até 24 horas, desde que as amostras sejam mantidas nesta temperatura.
8. Centrifugar a 13.000g a 4°C por 5 minutos. Após este processo, pode ser possível visualizar o pellet de RNA.
9. Desprezar o sobrenadante em descarte comum, com o cuidado de não descartar o pellet, e ressuspender com 0.5mL de etanol absoluto, gelado preferencialmente. Vortexar vigorosamente.
10. Centrifugar a 13.000g a 4°C por 15 minutos. OBS.: Os passos 9 e 10 devem ser repetidos até a obtenção de um pellet branco ou preferencialmente transparente. No caso do órgão utilizado ser um fígado, pode-se precisar de até 6 repetições destes passos.
11. Desprezar o sobrenadante em descarte comum e deixar os tubos secando invertidos sobre papel filtro ou toalha dentro da capela do fluxo laminar até o máximo de 10 minutos. Após este tempo, provavelmente o pellet não se dissolverá mais.
12. Ressuspender o pellet em 100µL de água Milli-Q estéril.
13. Estocar a -80°C até o momento de uso

ATENÇÃO: Durante todo o procedimento, os tubos são mantidos em gelo picado. Salvo quando indicado, o descarte de qualquer material deve ser feito em um recipiente especialmente destinado ao descarte de fenólicos

Anexo 4.**TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTIUCIONAL PARA COLETA DE DADOS****SANTA CASA DO PARÁ**

Ilmo.

Sr.

Diretor Administrativo e Financeiro Santa Casa do Pará.

Eu, **SISSY MARIA DOS ANJOS MENDES**, matriculada sob o número 2016112480010 no programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em nível de Doutorado, da Universidade Federal do Pará, sob a orientação da professora Dra. Ândrea Kely Ribeiro dos Santos, venho solicitar a V. Sa. a autorização para coleta de dados nessa instituição, com a finalidade de realizar a pesquisa de Doutorado intitulada: **miRNAs no mecanismo das Fissuras Orais Não-Sindrômicas**. O objetivo geral será identificar o perfil de expressão global dos microRNAs em amostras de pacientes com fissura oral não sindrômica e seus controles sem fissura, da região norte do Brasil, para obter uma melhor compreensão dos mecanismos que levam à ocorrência destas malformações de fissuras orais e contribuir para o estabelecimento de medidas preventivas das mesmas.

A coleta de dados ocorrerá mediante amostras de material biológico (sangue periférico) dos indivíduos selecionados, utilizando tubo *Tempus Blood RNA* (Thermo fisher Scietnific, US) e estocados em temperatura de -20° C até a extração. Todos os indivíduos com fissuras orais não sindromicas e controle sem fissuras, possuirão entre dois e 12 meses de idade (período recomendado para primeira cirurgia corretiva da fissura oral). Coleta sangue do cordão umbilical de indivíduos com fissuras orais não sindromicas e controle sem fissuras ao nascimento, utilizando tubo *Tempus Blood RNA* (Thermo fisher Scietnific, US) e estocados em temperatura de -20° C até a extração do RNA, amostra de tecido da área fissurada, amarzeandos em scope com Rna later, e dados de questionário de Instrumento para coleta de informações sócio-clínicas do individuo.

Igualmente, assumo o compromisso de utilizar os dados obtidos somente para fins científicos, bem como de disponibilizar os resultados obtidos para esta instituição ao final do projeto.

Agradecemos antecipadamente e esperamos contar com a sua colaboração. Atenciosamente,
SISSY MARIA DOS ANJOS MENDES - Matrícula UFPA 2016112480010

Eu, ÂNDREA KELLY RIBEIRO DOS SANTOS Orientadora, responsabilizo-me pelo trabalho científico da aluna acima.

ÂNDREA KELLY RIBEIRO DOS SANTOS

Anexo 5.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AMOSTRA DE SANGUE**

Projeto/pesquisa: **miRNAs no mecanismo das Fissuras Orais Não-Sindrômicas**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Projeto/pesquisa: **miRNAs no mecanismo das Fissuras Orais Não-Sindrômicas**”, que tem como **pesquisador responsável Sissy Maria dos Anjos Mendes**, do Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará – Belém/PA.

Esta pesquisa pretende estudar os Micro Ácidos Ribonucleicos (miRNAs) expressos em portadores de fissuras orais, compreender o seu papel para a saúde e desenvolvimento das fissuras orais humanas. O que nos leva a fazer esta pesquisa é a importância de se entender como os microRNAs podem influenciar o surgimento de fissuras orais na nossa população. Para isso, é necessário coletar e estudar os micro-RNAs e coletar informações sócio ambientais e nutricionais das pessoas que desejam participar da pesquisa.

Caso você decida participar, você deverá fornecer 5 (cinco) nano de sangue periférico ou umbilical (conforme o grupo) e realizar uma entrevista sobre seus hábitos alimentares e de saúde com algum membro da equipe como fonte secundária de dados. O Sangue será coletado junto com os exames obrigatórios prévios para os atos cirúrgicos corretivos da fissura oral e irão ser processados no laboratório de genética da UFPA, que permitirão o estudo do material genético.

Afirmo(a) que aceitei participar por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer ônus e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa.

Fui informado(a) dos objetivos estritamente acadêmicos do estudo, que, em linhas gerais será identificar o perfil de expressão global dos Micro RNAs na fissura oral não sindrômica, além de Identificar os miRNAs envolvidos nas fissuras orais não sindrômicas, em uma população da Região Norte do Brasil. - Caracterizar os dados sócio epidemiológicos maternos. - Verificar Ancestralidade.

Fui também esclarecido(a) de que os usos das informações por mim oferecidas estão submetidos às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde. Minha colaboração se fará de forma anônima, por meio de coleta de dados ocorrerá mediante amostras de 5 cinco nano de sangue periférico dos indivíduos selecionados, utilizando Tempus Blood RNA tube (Thermo fisher Scientific, US) e estocados em temperatura de 20° C até a extração do RNA. Todos os indivíduos com fissuras orais não sindrômicas e Controle sem fissuras, possuirão entre 2 e 12 meses de idade (período recomendado para primeira cirurgia corretiva da fissura oral). E de no caso de neonatos, Coleta sangue cordão umbilical de indivíduos com fissuras orais não sindrômicas e Controle sem fissuras ao nascimento utilizando Tempus Blood RNA tube (Thermo fisher Scientific, US) e estocados em temperatura de 20° C até a extração do. O acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelo(a) pesquisador(a) e/ou seu(s) orientador(es) / coordenador(es).

Os riscos para os participantes da pesquisa são mínimos e estão associados aos riscos de infecção por contaminação no momento da coleta de sangue. Por isso, providenciaremos luvas de látex que poderão ser utilizadas durante a coleta. Não há benefícios diretos para o participante, mas você estará ajudando na realização de pesquisas científicas que podem futuramente entender o processo de desenvolvimento de fissuras orais, assim como o desenvolvimento de terapias.

A sua participação nesta pesquisa não é obrigatória, e você tem o direito de se retirar da pesquisa a qualquer momento. A sua identidade será preservada durante todo o decorrer da

pesquisa, garantindo o seu sigilo e privacidade. Você possui o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa.

Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas ligando para SISSY MARIA DOS ANJOS MENDES ou ÂNDREA RIBEIRO DOS SANTOS, telefones (91) 981165125 e (91) 32017843 que podem ser encontradas no endereço: Rua Augusto Corrêa, nº 01, Guamá, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará. Se você tiver algum gasto pela sua participação nessa pesquisa, ele será assumido pelo pesquisador e reembolsado para você. Se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você será indenizado.

O CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) e o CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) são responsáveis por garantir a sua integridade enquanto participante da pesquisas e examinar os aspectos éticos deste estudo. CEP: **Santa Casa do Pará** – Rua Bernal do Couto, 1040 - Umarizal, Belém/Pará fone: **(91) 4009-2200** ou com o CONEP - SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3o andar, Asa Norte, Brasília – DF, fone: (61) 3315-5877. Este documento foi impresso em duas vias. Uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável SISSY MENDES

Consentimento Livre e Esclarecido

Após ter sido esclarecido sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados nessa pesquisa, além de conhecer os riscos e benefícios que ela trará para mim e ter ficado ciente de todos os meus direitos, concordo em participar da pesquisa “Projeto/pesquisa: **miRNAs no mecanismo das Fissuras Orais Não-Sindrômicas**”, e autorizo a divulgação das informações por mim fornecidas em congressos e/ou publicações científicas desde que nenhum dado possa me identificar.

Assinatura do participante da pesquisa/representante legal

Declaração do pesquisador responsável

Como pesquisador responsável pelo estudo “Projeto/pesquisa: **miRNAs no mecanismo das Fissuras Orais Não-Sindrômicas**”, declaro que assumo a inteira responsabilidade de cumprir fielmente os procedimentos que foram esclarecidos e assegurados ao participante desse estudo, assim como manter sigilo e confidencialidade sobre a identidade do mesmo. Declaro ainda estar ciente que na inobservância do compromisso ora assumido estarei infringindo as normas e diretrizes propostas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS, que regulamenta as pesquisas envolvendo o ser humano.

Belém, ____ de _____ de 20____. _____ **Assinatura do pesquisador responsável**

Anexo 6.**CARTA DE ACEITE DA INSTITUIÇÃO PARCEIRA**

GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICORDIA DO PARÁ
DIRETORIA DE ENSINO E PESQUISA
GERÊNCIA DE PESQUISA

CARTA DE ACEITE

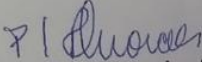
Declaramos para os devidos fins, que o projeto de pesquisa intitulado "**mirNAS no mecanismo das fissuras orais não-sindrômicas**", foi aceito por esta Instituição, para ser realizado no setor **GAMB e GCIR**.

A coleta de dados será realizada por meio de análise de material biológico.

Informamos que o mesmo tem como pesquisadora responsável **Profa. Dra. Andrea Kelly Campos Ribeiro dos Santos**. A coleta de dados será realizada pela pesquisadora assistente **Sissy Maria dos Anjos Mendes** no período de Dezembro de 2019 a Abril de 2020.

OBS: Este projeto necessita de aprovação do Comitê de Ética da Fundação Santa Casa para que seja iniciada a coleta de dados. (Conforme Resolução nº466/2012 Conselho Nacional de Saúde)

Belém, 14 de Novembro de 2019.


Dra. Sílvia Ferreira Nunes
Gerência de Pesquisa/ FSCMP

Pilar Maria de O. Moraes
Assessora de Ensino,
Pesquisa e Extensão
FSCMP

*Esta carta tem validade de 6 (seis) meses para ser submetida ao CEP-FSCMP

MISSÃO da FSCMP: "Cuidar da saúde das pessoas gerando conhecimento".

Anexo 7.**Publicações realizadas no período do Doutorado****1. XXXXXXXX****2. XXXXXXXX**