



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

INVESTIGAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS NA
ETIOLOGIA DE FENDAS OROFACIAIS TÍPICAS

Milena Simioni

Campinas, 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

INVESTIGAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS NA ETIOLOGIA DE FENDAS OROFACIAIS TÍPICAS

Milena Simioni

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas. Sob orientação Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes e co-orientação Profa. Dra. Claudia Vianna Maurer Morelli

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Si45i Simioni, Milena, 1983 -
Investigação de fatores genéticos na etiologia de
fendas orofaciais típicas / Milena Simioni. -- Campinas,
SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Vera Lúcia Gil da Silva Lopes.
Coorientador : Claudia Vianna Maurer Morelli.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fenda labial. 2. Fenda palatina. 3.
Anormalidades craniofaciais. 4. Microarranjos de DNA.
I. Lopes, Vera Lúcia Gil da Silva. II. Morelli, Claudia
Vianna Maurer. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Investigation of genetic factors on the etiology of orofacial clefts.

Palavras-chave em inglês:

Cleft of lip

Cleft palate

Craniofacial abnormalities

Microarray

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Vera Lúcia Gil da Silva Lopes [Orientador]

Têmis Maria Félix

Ana Cristina Victorino Krepischi

Mônica Barbosa de Melo

Carmen Sílvia Passos Lima

Data da defesa: 27-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Milena Simioni

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes
Co-Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli

Membros:

Professor (a) Doutor (a): Tereza Maria Félix

Professor (a) Doutor (a): Ana Cristina Victorino Krapisch

Professor (a) Doutor (a): Mônica Burrows de Melo

Professor (a) Doutor (a): Carmem Sônia Passos Lima

Professor (a) Doutor (a): Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/02/2012

Dedico esta tese à minha querida e amada família. Aos meus melhores amigos: meus pais Anésia e Celso, às minhas irmãs Lenita e Daniela, aos meus sobrinhos thutchucos Gabriel (batata) e Lucas (bolacha) e aos meus cunhados/irmãos Alessandre e ao recém chegado, Augusto. Obrigada pelo amor, pelas palavras de incentivo e sabedoria. Louvo à Deus pela vida de cada um de vocês!

Agradecimentos

Como é bom finalizar uma etapa da vida e ver que o esforço valeu a pena...

Como é bom poder sentir o coração agradecido por tudo o que se passou...

Como é bom ter muitas pessoas queridas e amadas para dividir esse momento e ter a oportunidade de agradecê-las pela ajuda e pelo apoio...

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes. Vera, obrigada por ao longo destes anos você ter sido muito mais que minha orientadora. Agradeço por você ser minha amiga e minha “mãe” também. Obrigada por ter confiado em mim para realização de mais um trabalho, pelas palavras de incentivo, por vibrar junto a cada experimento que dava certo.

Agradeço a minha co-orientadora Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli. Agradeço por todo o carinho, disposição em me ajudar e pelas palavras de sabedoria. Agradeço por ser minha “co-mãe”.

Agradeço à banca examinadora pela disposição em participar na contribuição para o crescimento deste trabalho.

Agradeço à Maria Eugênia Camargo do Laboratório de Microarranjos do Síncrotron que me ajudou na realização da técnica de *aGH*. Agradeço pela paciência para comigo em dias estressantes e cansativos.

Agradeço a todos os pacientes e pais que aceitaram participar deste projeto.

Agradeço à Fapesp e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Genética Médica que participaram do meu crescimento profissional.

Agradeço ao pessoal da limpeza que cuida dos nossos laboratórios.

Agradeço aos amigos de longa data, Társis e Érika, do antigo “quarteto fenomenal da Vera” que já não estão mais na Unicamp, mas que fazem parte deste trabalho.

Agradeço a minha querida amiga Ilária. Obrigada por estar desde o começo deste trabalho comigo, pela amizade sincera, pelo carinho, pelos cafés, pelas conversas, pela presença.

Agradeço a minha primeira “filha profissional” Gabriele. Obrigada por toda ajuda nos experimentos e pelo olhar compreensivo. Agradeço a Deus pela sensibilidade que Ele lhe deu para acolher as pessoas.

Agradeço a um trio de amigos que “ganhei” em um momento da vida em que eu perdia: Tânia, Renata e Alexandre (Le). Tânia, obrigada por estar sempre disposta em me ajudar nos experimentos, pelas conversas filosóficas, pelas caronas, pela companhia diária. Re, obrigada pela companhia nos almoços, a ajuda com os pacientes e com as contas do projeto auxílio, pelo carinho. Le, agradeço por você estar sempre presente, estar sempre por perto e por cuidar de mim.

Agradeço a duas amigas muito especiais, Luciana e Simone. Obrigada por vocês fazerem parte da minha vida e por eu poder dividir minha vida com vocês. Obrigada pelos conselhos.

Agradeço ao meu amigo Rodrigo pelos abraços em todas as manhãs, pela ajuda com as análises dos dados e pela ótima companhia em viagens.

Agradeço a Deus por trabalhar em um lugar com pessoas maravilhosas e pelo ambiente de trabalho harmonioso. Agradeço a todos os meus amigos do Departamento de Genética Médica que estiveram comigo ao longo destes quatro anos: Karina Cunha, Marina, Renato (Zé Bola), Marilza, Daniel, Fábio Conte, Danyela Dogini, Daniela Furgeri, Daniela Souza, Estela, Lidiane, Lílian, Junior, Simoni, Karina, Aline, Madalena, Nilma, Romênia, Bibiana, Fernando, Jaíra, Laiara, Mailme, Marcelo, Miriam, Romênia, Ana Paula, Juliana Loira, Juliana Morena, Joana, Fabíola e outros... É um privilégio trabalhar com cada um de vocês!

Agradeço a todos os outros amigos que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim. Aos meus amigos da Igreja, da época da escola, da época da faculdade, os amigos de infância...

Agradeço a uma pessoa extremamente especial que Deus me deu a graça de conhecer melhor ao longo destes quatro anos, Fábio Rossi Torres. Confesso ser difícil em poucas palavras lhe agradecer por tudo o que você fez por mim e pelo o que você representa para mim. Obrigada por eu sempre poder contar com você...

Agradeço à minha amiga/irmã Carolina R. Lincoln de Carvalho. Na capa da sua tese de mestrado, que você me deu, está escrito que meu nome deveria estar junto. Eu digo o mesmo para ti hoje. Muito mais que pela tese, agradeço a você por tudo o que fez e faz por mim sem pedir nada em troca. Em um versículo bíblico, está escrito que quem encontrou um amigo, encontrou um tesouro. Sua amizade para mim tem um valor inestimável! Sinto um orgulho enorme por ser sua amiga e por ser sua madrinha e do Pedro. Obrigada pela confiança de vocês dois! E também agradeço por todo o carinho que sua família tem por mim. Obrigada por ter-los como minha família do litoral.

Agradeço à minha família. Acho que teria que escrever uma outra tese para declarar todo o meu amor por cada um de vocês. Agradeço a Deus por ter uma família tão unida. Aos meus pais Celso e Anésia, pelo apoio de vocês em todos os momentos da minha vida, por toda estrutura que me deram ao longo da vida e por vocês serem meus melhores amigos. As minhas irmãs Lenita e Daniela, por toda dedicação a mim, pelas palavras de carinho, pelas longas conversas. Agradeço aos meus sobrinhos Gabriel (batata) e Lucas (bolacha) por vocês serem anjos na vida de minha família e pela alegria que sinto em meu coração em apenas ver o sorriso de vocês. Vocês são os amores da Tái! Agradeço ao meu cunhado Alexandre por cuidar de mim como uma irmã, por todos os conselhos. E agradeço ao meu mais novo cunhado Augusto pela amizade sincera que temos um com outro. Agradeço ao amor incondicional que vocês demonstram a mim todos os dias! Sem vocês, esta conquista não seria possível!

Agradeço a Deus. Agradeço, pois a conquista deste Doutorado é a realização de um dos projetos de Deus na minha vida. Agradeço todas as graças que Ele me concedeu e por toda providência divina. Agradeço a oportunidade que Deus me deu de aprimorar meus conhecimentos e de poder trabalhar com o que gosto. Agradeço por todos os lugares e países que pude conhecer ao longo destes quatro anos. Agradeço por cada uma das pessoas que Deus me deu a graça de conhecer. Agradeço a intercessão de Nossa Senhora a todos os meus pedidos. Senhor, tu és o tudo em meu nada!

Sumário

Lista de Ilustrações.....	XV
Figuras.....	XV
Tabelas.....	XI
Lista de Abreviaturas.....	XII
Resumo.....	XIX
Abstract	XXIII
1. Apresentação.....	XXVII
2. Introdução.....	31
2.1. Aspectos gerais.....	33
2.2. Embriologia da face e lábio.....	34
2.3. Embriologia do palato.....	37
2.4. Embriologia das fendas orofaciais típicas.....	39
2.5. Etiologia das fendas orofaciais típicas.....	40
2.5.1. Fatores ambientais.....	40
2.5.2. Fatores genéticos.....	41
2.5.2.1. Aberrações cromossômicas.....	41
2.5.2.2. Alterações gênicas.....	42
2.6. Evolução das ferramentas de investigação: da citogenética clássica à citogenética molecular e biologia molecular.....	54
2.6.1. Variações do genoma humano.....	56
2.6.2. Investigação de <i>CNVs</i> na gênese das FOTs: importância das técnicas de <i>array</i>	57
3. Objetivos.....	61
3.1. Objetivo geral.....	63
3.2. Objetivos específicos.....	63
4. Casuística.....	65
5. Métodos.....	73
5.1. Extração de DNA genômico.....	75
5.2. Técnica de <i>aGH</i>	75
5.2.1. Análise dos dados.....	79
5.2.1.1. Qualidade dos experimentos.....	79

5.2.1.2. Análise das <i>CNVs</i>	80
5.3. Triagem de mutação dos genes candidatos.....	82
5.3.1. Desenho dos oligonucleotídeos.....	82
5.3.2. Amplificação dos fragmentos de interesse.....	82
5.3.3. Sequenciamento automático.....	84
5.3.4. Testes <i>in silico</i>	85
5.4. Análises complementares.....	86
5.4.1. <i>FISH</i>	87
5.4.2. <i>MLPA</i>	87
6. Resultados	89
6.1. Investigação das <i>CNVs</i>	91
6.1.1. Qualidade dos experimentos de <i>aGH</i>	91
6.1.2. Análise das <i>CNVs</i>	91
6.1.3. Análise de <i>CNVs</i> nas regiões dos genes candidatos.....	95
6.2. Estudo dos casos com aberrações cromossômicas	97
6.3. Análise dos sequenciamentos dos genes candidatos.....	102
7. Discussão	109
7.1. Caracterização da amostra.....	111
7.2. Investigação genética das FOTs.....	112
7.2.1. Estudo das <i>CNVs</i>	114
7.2.2. Estudo das aberrações cromossômicas.....	116
7.2.3. Estudo dos genes candidatos.....	121
8. Conclusões	125
9. Perspectivas	129
10. Referências Bibliográficas	133
11. Anexos	173
ANEXO I. Protocolo de aprovação do CEP/Unicamp.....	175
ANEXO II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	177
ANEXO III. Tabelas com as condições de amplificação dos genes analisados.....	181

Lista de Ilustrações

Figuras

Figura 1. Desenvolvimento facial.....	35
Figura 2. Imagens do processo de desenvolvimento da face e lábio	36
Figura 3. Imagens do desenvolvimento do palato	38
Figura 4. Estrutura do gene <i>IRF6</i>	46
Figura 5. Estrutura do gene <i>FOXE1</i>	47
Figura 6. Estrutura do gene <i>GLI2</i>	48
Figura 7. Estrutura do gene <i>MSX2</i>	49
Figura 8. Estrutura do gene <i>SKI</i>	50
Figura 9. Estrutura do gene <i>SATB2</i>	51
Figura 10. Estrutura do gene <i>SPRY1</i>	52
Figura 11. Estrutura do gene <i>MSX1</i>	53
Figura 12. Estrutura do gene <i>FGF8</i>	54
Figura 13. Estrutura do gene <i>FGFR1</i>	54
Figura 14. Estrutura do gene <i>P63</i>	55
Figura 15. Exemplo do padrão dos produtos de PCR.....	77
Figura 16. Exemplo do padrão dos produtos da fragmentação.....	78
Figura 17. Fluxograma com os parâmetros considerados para a análise de <i>CNVs</i>	81
Figura 18. Ciclo <i>touchdown</i>	83
Figura 19. Ciclo gradiente.....	83
Figura 20. Ciclo utilizado na reação de sequenciamento.....	84
Figura 21. Deleção 1p36.11 no paciente 2.....	95
Figura 22. Duplicação 8p11.2 no paciente 6.....	96
Figura 23. Cariótipo parcial (400-550 bandas) dos cromossomos envolvidos na translocação da paciente 9.....	97
Figura 24. Perfil de hibridação dos cromossomos 4 e 5 do paciente 9.....	98
Figura 25. Cariótipo parcial (400-550 bandas) dos cromossomos envolvidos (paciente 21).....	99
Figura 26. Duplicação 15q25-26 no paciente 21.....	100
Figura 27. Duplicação 8p23 no paciente 21.....	100
Figura 28. Fotografia de uma metáfase do paciente 21.....	101

Figura 29. Confirmação da duplicação 8p23 no paciente 21 pela técnica de <i>MLPA</i>	101
Figura 30. Deleção 11p13 no paciente 21.....	102
Figura 31. Confirmação da deleção 11p13 no paciente 21 pela plataforma Agilent®	102
Figura 32. Cromatogramas do gene <i>MSX1</i>	104
Figura 33. Cromatogramas do gene <i>FOXE1</i>	105
Figura 34. Cromatogramas do gene <i>FGF8</i>	105
Figura 35. Cromatogramas do gene <i>GLI2</i>	106
Figura 36. Cromatograma evidenciando a inserção de bases e a mutação <i>frameshift</i> no gene <i>P63</i>	106
Figura 37. Cromatograma do fragmento clonado evidenciando a inserção das quatro bases AGAG (quadrado vermelho) no gene <i>P63</i>	107
Figura 38. Representação de uma porção do segmento duplicado da região cromossômica 15q25-q26.....	117
Figura 39. Representação do segmento deletado da região cromossômica 11p13.....	120
Figura 40. Representação do segmento deletado da região cromossômica 8p23.....	121

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação de genes envolvidos na etiologia das FOTs.....	44
Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes com FOT.....	68
Tabela 3. Resumo das <i>CNVs</i> encontradas na presente amostra de indivíduos com FOT.....	92
Tabela 4. Resumo das <i>CNVs</i> não descritas na base de dados <i>DGV</i>	93
Tabela 5. Polimorfismos encontrados nos genes analisados.....	103
Tabela 6. Alterações não descritas em base de dados encontrados nos genes analisados.....	104
Tabela 7. Síntese de todos os resultados encontrados.....	107

Lista de Abreviaturas

aGH: hibridação genômica em *arrays*

BAC: *Bacterial Artificial Chromosomes*

BSA: *bovine serum albumin*

CBS: *circular binary segmentation*

CGH: *Comparative Genomic Hybridization*

CNV: *Copy number variations*

CQC: *contast qc*

DNA: Ácido desoxiribonucleico

ECLAMC: Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas

EDTA: etilenediaminotetracetato dissódico 2H₂O

EEC: *Ectrodactyly, Ectodermal dysplasia, Cleft lip/palate syndrome*

ENSEMBL: *Ensembl Genome Browser*

DECIPHER: *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*

DMSO4: Dimetilsulfóxido

DGV: *Database of Genomic Variants*

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Tri-fosfatados (dCTP, dGTP, dATP, dTTP)

FISH: *fluorescence in situ hybridization*

FL/P: fendas labiais ou labiopalatais

FP: fenda palatal

FOT: fendas orofaciais típicas

G: ciclo gradiente

GCOS: GeneChip[®] Operating Software

HGMD: *Human Genome Mutation Database*

Kb: kilobases

M-FISH: *multicolor FISH*

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

MLPA: *Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

Pb: pares de base

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

SNP: *single nucleotide polymorphism*

SKY: cariotipagem espectral

SPP: síndrome de Pterígeo Poplíteo

SVW: síndrome de Van der Woude

Taq: *Thermus aquaticus*

TD: ciclo *touch down*

RESUMO

As fendas orofaciais típicas (FOT) são defeitos congênitos prevalentes que possuem múltiplas etiologias. Estudos populacionais apontaram diferentes genes relacionados às FOTs. Entretanto, em muitos casos, a etiologia permanece desconhecida. A investigação individualizada, utilizando em conjunto diferentes ferramentas laboratoriais, é uma abordagem mais complexa que pode contribuir na caracterização etiológica das FOTs. Assim, este estudo teve como objetivo investigar os fatores genéticos envolvidos na etiologia das FOTs em uma casuística composta por 23 indivíduos afetados, incluindo casos síndrômicos e não-síndrômicos, familiares e esporádicos. Participaram do grupo controle 20 indivíduos sem história familiar de fenda em três gerações. Todos os indivíduos portadores de FOT foram previamente avaliados por um médico geneticista e por exame de cariótipo em linfócitos, sendo dois casos detectados com aberrações cromossômicas. A análise de alterações no número de cópias de segmentos de DNA (*Copy Number Variation*, *CNVs*) por hibridação genômica em *arrays* (*aGH*), baseada na comparação com grupo controle, apontou um novo gene de candidato para FOT, o gene *TCEB3*, e identificou uma duplicação no gene *FGFR1*. Em um paciente com fenda palatal submucosa e quadro síndrômico, a utilização da técnica de *aGH*, em conjunto à hibridação *in situ* fluorescente (*FISH*) e *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (*MLPA*), possibilitou a caracterização da aberração cromossômica detectada pelo cariótipo. Em todos os portadores de FOT também foi realizado sequenciamento direto dos genes *IRF6*, *FOXE1*, *GLI2*, *MSX2*, *SKI*, *SATB2*, *SPRY1*, *MSX1*, *FGF8*, *FGFR1*; em um paciente específico, foi avaliado o gene *P63*. Alterações de sequência inéditas foram encontradas nos genes *FOXE1*, *MSX1*, *GLI2* e *FGF8*, assim como uma inserção no gene *P63*, cujos efeitos na proteína codificada deverão ser confirmados em estudos futuros. Os resultados deste trabalho exemplificam a diversidade de fatores genéticos envolvidos na etiologia das FOTs e o desenho de estudo utilizado mostrou a eficácia do uso concomitante de diferentes abordagens investigativas neste grupo de defeitos congênitos.

ABSTRACT

Typical oral cleft (TOC) is a prevalent and heterogeneous group of congenital defects with multiple etiologies, which remain unknown in several cases. Population studies detected several genes related to TOC. An individualized investigation, involving different laboratorial tools at same time, is an approach that can contribute on the etiological characterization of the TOC. The aim of this study was to investigate genetic factors involved on TOC in a sample composed by 23 individuals (syndromic and non-syndromic; familial and sporadic cases). The control group included 20 individuals without TOC in three generations. All patients were previously evaluated by clinical geneticists and performed karyotype test that showed chromosomal aberrations in two cases. Copy number variation (CNV) investigation by genomic hibridization in *arrays* (aGH), based in a comparative to control group data, detected a new candidate gene to TOC (*TCEB3*), and identified a duplication affecting *FGFR1* gene. In one patient with syndromic form of submucous cleft palate, the use of aGH technique, together with Fluorescent in situ hibridization (FISH) and Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), characterized the chromosomal aberration previously detected by karyotype. Direct sequencing of *IRF6*, *FOXE1*, *GLI2*, *MSX2*, *SKI*, *SATB2*, *SPRY1*, *MSX1*, *FGF8* and *FGFR1* genes was performed in all individuals; in a specific case, *P63* gene was investigated. New sequence alterations were found in *FOXE1*, *MSX1*, *GLI2* e *FGF8* genes, as well as an insertion in *P63* gene, which effects will be verified in futures studies. In conclusion, results here described reflect the diversity of genetic factors involved in the etiology of TOC and the type of study show the efficiency of the use of different techniques in the etiological investigation of this congenital defect.

APRESENTAÇÃO

1. Apresentação

As fendas orofaciais típicas (FOT), as quais incluem as fendas labiais ou labiopalatais (FL/P) e a fenda palatal (FP), constituem um grupo de defeitos congênitos comum, etiologicamente diverso, com elevada prevalência e considerável morbidade. Estudados há décadas, os mecanismos genéticos participantes da gênese destes defeitos são variados e não totalmente esclarecidos. Por estes motivos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou, em 2000, o projeto *Global Strategies to Reduce the Health-care Burden of Craniofacial Anomalies*. Este projeto tem como metas potencializar esforços e estabelecer necessidades prioritárias, consensos globais e protocolos comuns de pesquisa nessa área. Destacam-se, no conjunto das estratégias propostas, as pesquisas de interação gene-gene e gene-ambiente, cujas limitações incluem a heterogeneidade clínica-etiológica e a dificuldade de padronização nas investigações dos afetados e famílias ao redor do mundo.

O Projeto Crânio-face Brasil (PCFB) foi iniciado em 2003 no Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Trata-se de uma proposta multicêntrica e multiprofissional, cujo objetivo principal é trazer subsídios para melhoria no atendimento aos indivíduos com anomalias craniofaciais. Além de estudos relacionados à saúde pública e educação, este projeto tem estudos voltados para a área de investigação laboratorial, no qual esta Tese de Doutorado está inserida.

Durante minha graduação, participei de estudos na área das FOTs e, interessada na área de genética molecular, realizei estágio no Laboratório de Genética Molecular da FCM/ Unicamp. Durante o estágio, tive contato com o Projeto Crânio-Face Brasil e vi nele a oportunidade de aprofundar meus conhecimentos nessa área, o que ocorreu já na minha Dissertação de Mestrado.

Na época de conclusão do meu Mestrado, em 2008, iniciava-se um novo ciclo do Projeto Crânio-Face Brasil, com a perspectiva de estudos multicêntricos. Ao mesmo tempo, estratégias laboratoriais para estudo de variações no número de cópias de segmentos do DNA (*Copy Number*

variations - *CNVs*) estavam começando a surgir. Considerando que as FOTs têm mecanismos etiológicos complexos, esta pareceu uma excelente oportunidade de utilizar a estrutura do PCFB e agregar diferentes e novos conhecimentos em meu projeto de Doutorado. Um desafio, já que o conhecimento sobre *CNVs* na época era muito limitado e a técnica de hibridação genômica em arrays (*aGH*), até então, não havia sido implantada em nosso laboratório. A decisão incluiu, ainda, o sequenciamento de diferentes genes anteriormente relacionados às FOTs.

Gostaria de expressar minha satisfação por participar deste grupo de pesquisa em FOT, onde tive inúmeras oportunidades de aprendizado. Compartilho, aqui, os resultados de minha vivência científica nesses últimos quatro anos, com as quais espero contribuir para a identificação de fatores genéticos neste grupo de defeitos congênitos tão interessante e complexo.

INTRODUÇÃO

2. Introdução

2.1. Aspectos Gerais

As anomalias craniofaciais constituem o grupo mais comum entre os defeitos congênitos, sendo as fendas orofaciais as mais frequentes destas anomalias (1, 2). Apesar de heterogêneas, as fendas orofaciais podem ser divididas em dois grandes grupos: as fendas orofaciais típicas (FOT), que compreendem as fendas labiais ou labiopalatais (FL/P) e a fenda palatal (FP); e as fendas orofaciais atípicas, que são raras e compreendem as fendas faciais medianas, transversais, as oblíquas e as fendas do lábio inferior, segundo a classificação de Tessier (3).

As FPs são consideradas etiologicamente distintas das FL/P (1, 2) e, portanto, a prevalência também difere. A ocorrência de indivíduos com FL/P foi estimada entre 1/300 a 1/2000 nascidos vivos, e de indivíduos com FP em 1/1500 (4). Coletivamente, a ocorrência de FL/P e FP foi recentemente estimada em 1/700 nascidos vivos, variando conforme a origem geográfica, o grupo étnico, as condições do ambiente e o estado sócio-econômico. Em geral, asiáticos e americanos de origem indígena apresentam alta prevalência (1/500 nascidos vivos), e indivíduos de ascendência africana as menores prevalências (1/1000 nascidos vivos) (2, 5). Na América Latina, segundo dados do Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas de 2005 (6), a incidência de FL/P é de 11,5/10.000 nascimentos (1/850) e a incidência de FP é de 3,9/10.000 nascimentos (1/2500).

Tanto as FL/P como as FP podem ocorrer como anomalias isoladas, comumente denominadas não-sindrômicas, ou podem estar associadas a outras anomalias congênitas múltiplas, sendo comumente referidas como sindrômicas. A grande maioria dos casos (aproximadamente 70%) é considerada não-sindrômica. Os casos sindrômicos correspondem a quadros de anomalias cromossômicas, síndromes mendelianas, efeitos de teratógenos e quadros de múltiplas anomalias de origem desconhecida (1, 2).

Além do aspecto estético, as FOTs representam um significativo problema de saúde pública devido à morbidade ao longo da vida dos indivíduos afetados e por resultarem em complicações que afetam a sucção e a alimentação, a respiração e a fala. Assim, o tratamento multidisciplinar é necessário, incluindo tratamento cirúrgico, nutricional, dentário e ortodôntico especializado, intervenção na fala e audição, apoio psicológico e educacional, assistência social, diagnóstico etiológico e aconselhamento genético (1, 2, 4, 7).

Esse amplo impacto na vida do indivíduo afetado e de sua família, associado à prevalência significativa, enfatiza a importância em se conhecer as causas desses defeitos para o planejamento e otimização do tratamento, prognóstico individualizado e aconselhamento genético (4).

2.2. Embriologia da face e lábio

Os primórdios da face começam a aparecer no início da quarta semana da embriogênese humana. Antes do fechamento do tubo neural há intensa migração de células da crista neural para a região facial. Durante a migração, as células interagem com a matriz extracelular e epitélio adjacente o que, parcialmente, determina o tipo de tecido que essas formarão. Dentre esses, os tecidos nervoso, esquelético, conectivo e muscular (8, 9).

Eventos indutivos entre o prosencéfalo, rombencéfalo e tecido da crista neural, em migração para a região facial, fazem parte da formação dos cinco primórdios da face: a proeminência frontonasal, o par de proeminências mandibulares e o par de proeminências maxilares. Entre a quarta e a oitava semana do desenvolvimento (Figura 1), a diferenciação, o crescimento e a eventual fusão desses processos resultam na formação da face definitiva (8, 10). Ao final da nona semana, o cérebro está em crescimento e inicia-se o processo de ossificação das estruturas craniofaciais.

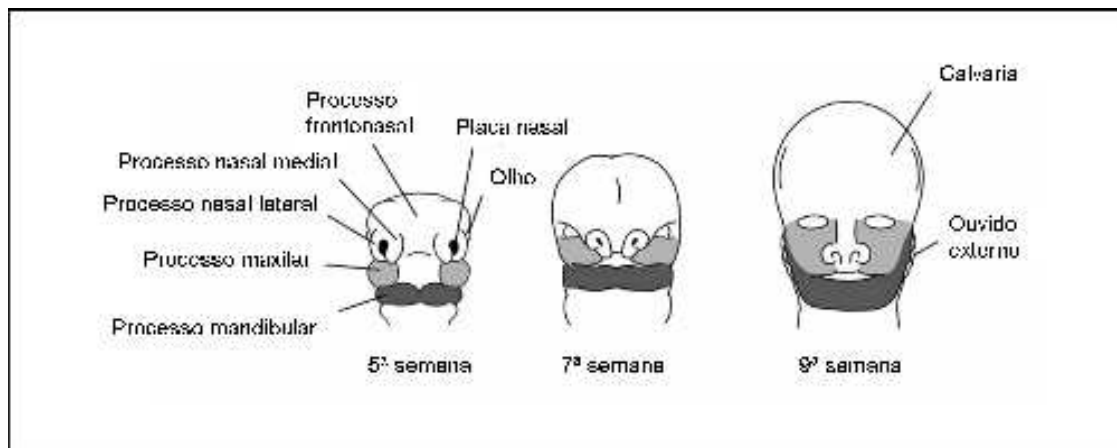


Figura 1. Desenvolvimento facial. Dois processos mandibulares (cinza escuro); dois processos maxilares (cinza claro) e processo frontonasal. Na sétima semana, visualizam-se as modificações na face. Na nona semana, a face apresenta o aspecto típico e os ossos craniofaciais começam a se desenvolver (10).

Com o crescimento dos cinco primórdios da face, forma-se uma depressão central na região facial conhecida como estomodeu, o precursor da boca. A proeminência frontonasal delimita o plano médio-rostral do estomodeu; o par de proeminências maxilares se dispõe bilateralmente; e o par de proeminências mandibulares também delimita as porções laterais e a porção caudal do estomodeu (Figura 2a). As saliências mandibulares e maxilares são derivadas do primeiro arco branquial (9, 11).

A proeminência frontonasal dá origem à testa, ao nariz e à parte medial da maxila e do lábio superior. As proeminências mandibulares dão origem à mandíbula, ao lábio inferior e às regiões inferiores da bochecha, e as proeminências maxilares dão origem às regiões superiores da bochecha e às partes laterais da maxila e lábio superior (8, 10, 11).

A mandíbula e o lábio inferior são as primeiras partes da face a se formarem. Resultam da fusão das extremidades mediais das proeminências mandibulares no plano mediano. Ao final da quarta semana, os placóides nasais desenvolvem-se nas partes ínfero-laterais da proeminência frontonasal (Figura 2b). Durante a quinta semana, o mesênquima das margens dos placóides prolifera, produzindo as proeminências nasais mediais e laterais (Figura 2c). Como resultado, os

placóides nasais ficam situados no fundo de depressões, denominadas fossetas nasais que constituem os primórdios das narinas e das cavidades nasais (8, 9).

Ao final da sexta e começo da sétima semana, a proliferação do mesênquima nas proeminências maxilares faz com que estas aumentem de tamanho e cresçam medialmente em direção uma à outra e às proeminências nasais, iniciando o processo de formação das porções laterais das narinas e superior das bochechas. Entre a sétima e a décima semana, a formação do lábio superior ocorre pelo movimento lateral das proeminências maxilares e ao processo de fusão no plano mediano das proeminências nasais mediais (Figura 2d) (8, 9).

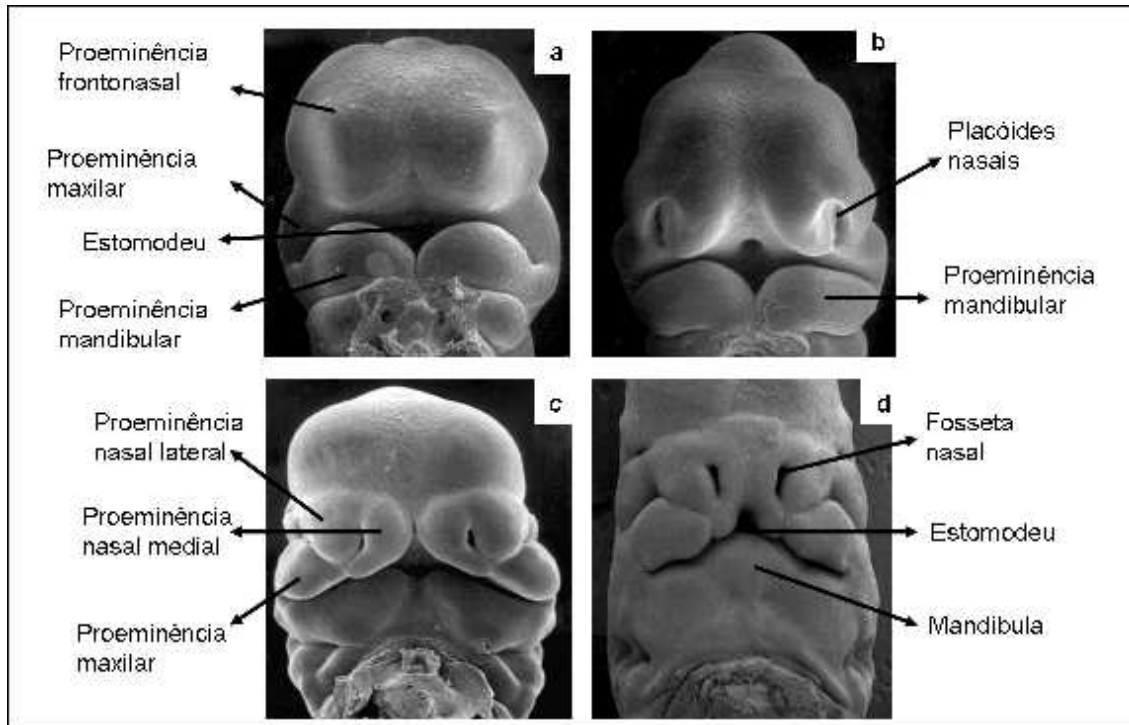


Figura 2. Imagens do processo de desenvolvimento da face e lábio. Fonte das imagens: *Facial Embriology* (www.med.unc.edu/embryo).

2.3. Embriologia do palato

O processo de desenvolvimento do palato inicia-se na quinta semana de gestação e termina no final da 12ª semana. O palato definitivo é formado a partir de dois primórdios: o palato primário e o palato secundário (8, 11).

O palato primário começa a se formar a partir do desenvolvimento do segmento intermaxilar da maxila. Esse tecido é derivado de um processo de fusão entre as proeminências maxilares e as proeminências nasais mediais (Figura 3b). O segmento intermaxilar dá origem à parte central (o filtro) do lábio superior e à parte pré-maxilar da maxila (11).

Os primórdios do palato secundário, que formam o palato duro e o palato mole começam a desenvolver-se no início da sexta semana, a partir de duas projeções mesenquimais derivadas das proeminências intermaxilares. Inicialmente, essas estruturas conhecidas como proeminências palatinas (Figura 3a) se projetam ínfero-medialmente a cada lado da língua (Figura 3c). Com o desenvolvimento da maxila, a língua torna-se relativamente menor e desloca-se para uma posição inferior. Durante a sétima e oitava semana, as prateleiras palatinas laterais se alongam e ascendem para uma posição horizontal superior à da língua (Figura 3d). Gradativamente, as prateleiras se aproximam uma da outra, se fundindo no plano mediano (Figura 3e). Estas também se fundem ao septo nasal e à parte posterior do palato primário (Figura 3f) (8).

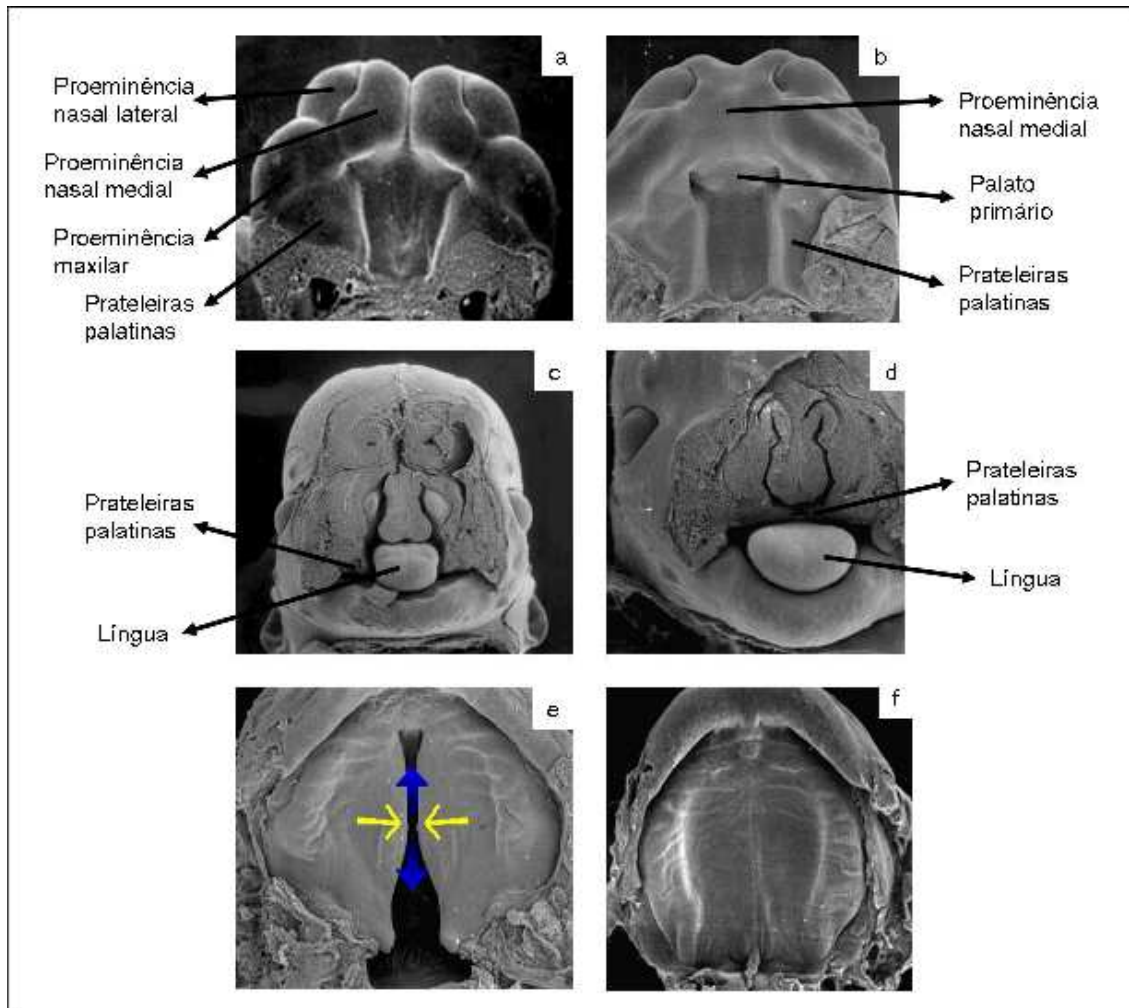


Figura 3. Imagens do desenvolvimento do palato. **a)** 6ª semana: visualização das prateleiras palatinas, que são consideradas parte das proeminências maxilares. **b)** 7ª semana: proeminências nasais mediais e maxilares se fundindo para formar o palato primário. **c)** 8ª semana: corte frontal mostrando a língua entre as prateleiras palatinas. **d)** 9ª semana: prateleiras palatinas se posicionam acima da língua para continuar o processo de fusão. **e)** 9ª semana: as setas amarelas indicam o fechamento das prateleiras palatinas na posição central e as setas azuis mostram o direcionamento da fusão antero-posterior a partir do centro. **f)** 10ª semana: a fusão das prateleiras palatinas uma com a outra e com septo nasal está completa. Fonte das imagens: *Facial Embriology* (www.med.unc.edu/embryo).

A ossificação do palato inicia-se durante a oitava semana com o desenvolvimento de osso no palato primário, formando a porção pré-maxilar da maxila onde se desenvolverão os dentes

incisivos. Simultaneamente, ocorre a difusão de osso para dentro do mesênquima das prateleiras palatinas fundidas, formando o palato duro. Não ocorre ossificação na parte mais posterior do palato, o que origina o palato mole e a úvula. Um pequeno canal nasopalatino persiste no plano mediano do palato entre a parte pré-maxilar da maxila e os processos palatinos da maxila. Esse canal é representado no palato duro adulto pelo forame incisivo (8).

2.4. Embriologia das fendas orofaciais típicas

Como visto anteriormente, o desenvolvimento da face e do palato envolve uma série de eventos complexos, como migração, crescimento, diferenciação celular e apoptose que devem ocorrer de maneira coordenada (5). Qualquer alteração nesta precisa cascata de eventos pode resultar em FOT (1, 5, 9).

Fatores que inibem a migração das células da crista neural ou diminuem sua quantidade nos primórdios faciais tornam inadequado ou impossível o contato entre esses. Qualquer alteração no crescimento do mesênquima pode ser crítica para o fechamento das proeminências maxilares com as proeminências nasais. Falhas na diferenciação do mesênquima para tecido ósseo podem afetar o posicionamento do palato mole ou duro. Se o processo de morte celular programada no epitélio que cobre as proeminências faciais não ocorrer adequadamente, não há fusão das mesmas (5).

Qualquer mudança na posição das proeminências nasais ou crescimento mal direcionado das proeminências faciais pode resultar em FL (9). Já as fendas palatais podem ocorrer devido aos defeitos primários na palatogênese ou podem ser secundárias aos distúrbios em outras estruturas craniofaciais. Os defeitos primários incluem falhas no crescimento, elevação ou fusão das prateleiras palatinas. Os defeitos secundários podem ser distúrbios de crescimento ou da morfologia de estruturas craniofaciais, incluindo a base craniana e/ou obstrução mecânica da elevação das prateleiras palatinas pelo tamanho ou posicionamento anormal da língua (4, 9, 10).

As FOT podem ser anatomicamente classificadas em dois grupos: fenda envolvendo apenas o palato secundário (regiões duras e moles), denominada fenda palatal isolada (FP) e fenda envolvendo o lábio superior e a parte anterior da maxila, abrangendo apenas o palato primário, denominada fenda labial ou labiopalatal (FL/P). Esta distinção é baseada em evidências embriológicas e etiológicas (8, 12). Desta maneira, um indivíduo com FL/P pode ter um outro membro da família afetado por FL ou FL/P, mas raramente por FP. Do mesmo modo, se um indivíduo possui FP, um outro indivíduo afetado na família geralmente tem apenas FP, e não FL (9). Algumas exceções podem ocorrer como em famílias com mutações em genes específicos que podem ocasionar tanto a FL/P como FP (9, 13, 14).

Entretanto, tal classificação anatômica vem sendo questionada. Alguns trabalhos levantaram a hipótese de que a FL seria uma condição distinta (2, 15). As FLs têm como origem uma malformação do palato primário apenas, enquanto que as fendas labiais com fenda palatal envolvem tanto o palato primário como secundário (2). Além disso, a partir de um estudo populacional, observou-se a necessidade de se tratar as FLs como uma condição distinta (15).

2.5. Etiologia das fendas orofaciais típicas

2.5.1. Fatores ambientais

A contribuição de fatores ambientais na etiologia das FOT é sugerida em diversos trabalhos. A maioria dos casos é de etiologia multifatorial e, portanto, vários fatores ambientais têm sido considerados (16). Teratógenos reconhecidos que causam FOT incluem os de exposição rara, como à fenitoína, ácido valpróico (drogas anticonvulsivantes) e talidomida (17); e também os de exposição comum, como ao álcool (16, 18) e fumo (17, 19, 20).

O estado nutricional de mulheres grávidas também tem recebido bastante atenção com respeito à incidência de FOT. A baixa ingestão de vitaminas do complexo B, juntamente com exposição excessiva ou deficiente à vitamina A, foram associadas a risco aumentado de FOT (20).

A interação entre fatores ambientais e genéticos deve ser considerada devido à complexidade etiológica das FOTs (20). Apesar de controversos, existem estudos abordando a interação entre o fumo e genótipo materno no gene *MTHFR* (*methylenetetrahydrofolate reductase*) para o desenvolvimento de FOT (21, 22, 23).

2.5.2. Fatores genéticos

O estudo das FOT possui uma longa história na genética humana, sendo um modelo para estudos de doenças complexas, em geral. A importância do componente genético na determinação das fendas pode ser verificada pela alta agregação familiar, pelos riscos de recorrência e pela alta concordância em estudos de gêmeos.

A agregação familiar foi constada em vários estudos. Se um filho é afetado, o risco de recorrência é de 3% a 4%, aumentando para 9% se houver dois filhos afetados. Havendo um genitor afetado o risco é de 11% para a prole e, no caso de dois genitores afetados, 34% (24, 25). Porém, em um estudo que avaliou 2,1 milhões de pacientes com FOT entre 1967 e 2001 na Noruega, 3,6% das mulheres e 4,7% dos homens portadores tiveram filhos afetados (26). Em estudos brasileiros, 35% dos indivíduos com FOT avaliados apresentavam histórico na família (27) e o risco de recorrência total de FL/P não-sindrômica foi estimado em 1,5–1,6%, variando de acordo com a região do país (28).

Estudos com gêmeos têm demonstrado uma forte predisposição genética. Para casos não-sindrômicos, a concordância varia de 40% a 60% em gêmeos monozigóticos contra 3 a 5% em gêmeos dizigóticos (29, 30).

2.5.2.1. Aberrações cromossômicas

As FOT são encontradas como parte do fenótipo de indivíduos com diferentes tipos de rearranjos cromossômicos, incluindo trissomias, translocações e inversões, duplicações, deleções e microdeleções (4). Em dois trabalhos avaliando fetos com FOT, encontrou-se frequência de 24%

(31) e 51% (32) de anomalias cromossômicas, sendo a grande maioria dos casos referentes às trissomias dos cromossomos 13 e 18.

Em um estudo que analisou estatisticamente as aberrações cromossômicas associadas a malformações, Brewer et al. (33) encontraram deleções significativamente associadas à FL em 1q21-25, 4p15-16, 4q31-35, 7q34-35. Para FP, as regiões significativamente associadas foram 2q32, 4p13-16, 4q31-35 (33). Com o mesmo tipo de análise, esses autores encontraram duplicações significativamente associadas à FL em 3p26-21, 10p15-11, 11p14-11, 13q22-34. Para FP as regiões significativamente associadas foram 3p24-23, 3p26, 3q23-25, 7q22-32, 8q21, 10p15-11, 14q11-21, 16p12-13 e 22q12-13 (34).

Em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (35), 39 indivíduos com FL/P e FP foram analisados através da técnica de cariótipo convencional e, em casos específicos, por outras técnicas de citogenética molecular. Foram encontradas nove alterações cromossômicas (23% dos casos). Dentre essas estão deleção 4p, deleção 4p16, deleção 18q22 (2 indivíduos) e cromossomos marcadores supranumerários em mosaico (5 indivíduos).

2.5.2.2. Alterações gênicas

Existem aproximadamente 400 síndromes já descritas na base de dados do OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>) que apresentam FL/P ou FP como parte do espectro fenotípico (26, 36), sendo que mais da metade dessas síndromes têm um padrão de herança monogênico (36, 37). Entretanto, a maioria dos casos de FL/P (70%) e 50% dos casos de FP é não-sindrômico (1, 16, 17, 26, 38).

Alterações patogênicas em mais de um gene tem sido apontadas como necessárias para a ocorrência de FOT, já que a formação dos lábios e palato envolve vários processos celulares (proliferação, diferenciação, adesão e apoptose) e a falha em qualquer um destes pode resultar em fenda (39). Os estudos de segregação e análises estatísticas do risco de recorrência familiar são

compatíveis com a hipótese do envolvimento de um *locus* de maior efeito ou de 3 a 14 *loci*, interagindo para causar fenda (40).

A identificação de genes envolvidos na etiologia das FOT é baseada em estudos com modelos animais (41), de associação e ligação, e análise de genes candidatos (1, 2). Esse empenho pode ser observado na vasta lista de genes relacionados às FOTs (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de genes envolvidos na etiologia das FOTs. Dados de estudos com modelos animais, análise de expressão, ligação ou associação e mutações descritas (alterações citogenéticas envolvendo o *locus* do gene, deleções ou duplicações envolvendo o gene ou mutações de sequência patogênicas).

Gene	Locus	Função	Modelo Animal	Análise da expressão	Ligação ou Associação	Mutação descrita	Referências
<i>BCL3</i>	19q13.32	FT	-	-	+	-	20, 42, 43, 44, 45
<i>BMP4</i>	14q22.2	FC	+	+	+	-	1, 46, 47, 48, 49, 50
<i>FGF8</i>	10q24	FCF	+	+	-	+	4, 51, 52, 53, 54
<i>FGFR1</i>	8p11.2	FCF/R	+	-	+	+	20, 54, 55
<i>FOXE1</i>	9q22	FT	+	+	+	+	20, 56, 57, 58, 59
<i>GLI2</i>	2q24	FT	+	+	-	+	58, 60
<i>IRF6</i>	1q32.2	FT	+	+	+	+	1, 4, 20, 59, 61, 62, 63, 64
<i>JAG2</i>	14q32	FT	+	+	+	+	58, 65, 66, 67
<i>MSX1</i>	4p16.2	FT	+	+	+	+	1, 4, 20, 38, 58, 68, 69, 70
<i>MSX2</i>	5q35.2	FC	+	-	-	+	58, 71
<i>P63</i>	3q28	FT	+	+	+	+	4, 20, 72, 73, 74
<i>PVRL1</i>	11q23.3	AC	-	+	+	+	20, 75, 76, 77, 78, 79
<i>RARA</i>	17q21	SC	+	+	+	-	20, 80, 81, 82, 83
<i>SATB2</i>	2q33	FT	+	+	-	+	58, 84, 85, 86
<i>SHH</i>	7q36	H	+	+	-	-	4, 53, 87
<i>SKI</i>	1p36.3	FC	+	+	+	+	58, 88, 89
<i>SPRY1</i>	4q28.1	FC	+	+	-	-	90
<i>SUMO1</i>	2q33	U	+	+	-	+	91, 92, 93, 94, 95
<i>TBX22</i>	Xq21.1	FT	+	+	+	+	4, 20, 96, 97, 98
<i>TGFA</i>	2p13	FC	-	+	+	+	4, 20, 64, 77, 94, 99, 100, 101, 102
<i>TGF-β3</i>	14q24	FC/T	+	+	+	+	20, 69, 103, 104, 105, 106, 107, 108

Legenda: FT: fator de transcrição, FC: fator de crescimento, FCF: fator de crescimento de fibroblasto, FCF/R: receptores de crescimento de fibroblasto, AC: adesão celular, SC: sinalização celular, H: *Hedgehog*, U: ligase de ubiquitina, FC/T: fator de crescimento transformador.

Considerando o fenótipo de modelos animais, o padrão de expressão e estudos de ligação e/ou associação, Vieira et al. (58) analisaram, através de sequenciamento direto, um total de 20 genes candidatos (*FOXE1*, *GLI2*, *ISGF3G*, *JAG2*, *LHX8*, *MSX2*, *NAT1*, *OSR2*, *P63*, *PAX9*, *SATB2*, *SKI*, *SPRY1*, *SPRY2*, *TBX1*, *TBX10*, *TGFA*, *TGFB1*, *TGFB3* e *TGFBR1*) em 184 indivíduos com FL/P não-sindrômica e história familiar positiva para fenda. Foram encontradas 256 alterações de sequência, sendo que em nove genes (*FOXE1*, *GLI2*, *JAG2*, *LHX8*, *MSX2*, *SATB2*, *SKI*, *SPRY2* e *TBX10*), 15 alterações foram consideradas como tendo potencial patogênico. No caso do gene *MSXI*, foi avaliada apenas a mutação P147Q, descrita anteriormente por Suzuki et al. (109). Tal alteração foi encontrada em dois dos 1098 casos de FL/P avaliados para esta mutação, mas não foi observada em 1600 controles analisados. Ao final do estudo, os autores sugerem que, em conjunto, mutações de sequência nos genes *FOXE1*, *GLI2*, *MSX2*, *SKI*, *SATB2*, e *SPRY2* contribuem com 6% dos casos de FL/P, especialmente nos casos com fenótipo mais grave ou com recorrência familiar.

Neste contexto, a revisão de Vieira (39) estimou a porcentagem de contribuição de determinados genes para as FOTs. A contribuição do gene *IRF6* foi estimada em 12% (110), mutações nos genes descritos por Vieira et al. (58) contribuem para aproximadamente 6% dos casos, mutações no gene *MSXI* contribuem para 2% (111, 112) e mutações nos genes *FGFs* para 3% do total dos casos de fenda (54).

Entre os genes descritos, alguns merecem destaque e serão descritos a seguir.

Gene *IRF6*

O gene *IRF6* (*interferon regulatory factor 6*) pertence a uma família de fatores de transcrição composta de nove genes com um domínio de ligação ao DNA altamente conservado do tipo hélice-alça-hélice e um domínio menos conservado de ligação às proteínas (C-terminal) (113). Este gene, mapeado na região cromossômica 1q32.2, apresenta nove exons (Figura 4), sendo

destes sete exons transcritos e traduzidos que produzem uma proteína de 467 resíduos, segundo a construção genômica hg18 (*Human Genome Building* NCBI36).

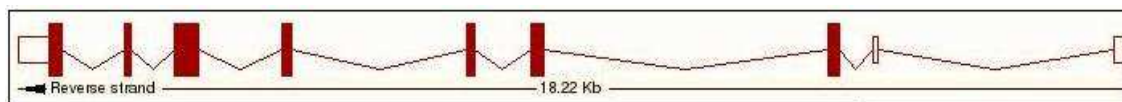


Figura 4. Estrutura do gene *IRF6*: sete exons traduzidos ressaltados em vermelho (código do *Ensembl Genome Browser* ENST00000367021 [hg18]).

Kondo et al. (13) conduziram análises de expressão gênica em camundongos, e essas demonstraram que os transcritos do gene *IRF6* apresentam altos níveis de expressão nas prateleiras palatais antes e durante a fusão, e também nos brotos dentários, folículos capilares, genitália e pele. Tal padrão de expressão está em concordância com o fenótipo das síndromes de Van der Woude (SVW) e Pterígeo Poplíteo (SPP), anteriormente associadas ao *locus* deste gene (114, 115). Camundongos mutantes para o gene *Irf6* apresentaram anormalidades na pele, maxila, membros, ausência de orelhas e fenda de palato secundário (62).

No mesmo trabalho, Kondo et al. (13) descrevem as primeiras mutações encontradas no gene *IRF6* em SVW. Inicialmente, pelo estudo de um par de gêmeos monozigóticos com fenótipo discordante, a mutação Glu92X foi encontrada apenas no indivíduo afetado pela síndrome de SVW do par de gêmeos. Os pais (não afetados) também não apresentaram esta alteração. Em seguida, outras mutações foram identificadas em 45 famílias com indivíduos portadores das SVW e em 13 famílias com SPP. Dentre as famílias de SVW com mutações encontradas, o fenótipo de FOT apresentou-se variado, havendo ocorrência de indivíduos com FL e FP na mesma família. Posteriormente, inúmeros trabalhos também relataram mutações no gene *IRF6* em casos de pacientes com as SVW e SPP que apresentavam tanto FL/P como FP (116, 117, 118, 119, 120, 121).

Nos trabalhos de Zuccherro et al. (110) e Pegelow et al. (122), mutações patogênicas não foram encontradas no gene *IRF6* em indivíduos com FOT não-sindrômica. Entretanto, mutações

em duas famílias segregando FL e FP não-sindrômica foram reladas por Rutledge et al. (123). Além disso, em famílias segregando tanto FL/P como FP em casos de SVW com ausência de fossetas labiais quatro mutações no gene *IRF6* foram descritas por Jehee et al. (124), sendo apenas três exons deste gene avaliados neste estudo.

Tanto em estudos de ligação como associação em indivíduos com fenda não-sindrômica, resultados positivos para o gene *IRF6* foram encontrados em varias populações, como chinesa (125), caucasóide e espanhola (126), italiana (61), chilena (127), e também na população da América do Sul, incluindo a brasileira (63). Destaca-se o trabalho de Zuccherro et al. (110), o primeiro a associar o polimorfismo V274I à FOT não-sindrômica em diferentes populações incluindo a brasileira e a filipina.

Gene *FOXE1*

O gene *FOXE1*, também conhecido por TTF-2 (*thyroid transcription factor 2*), é membro da família *forkhead* (referindo-se ao domínio de ligação ao DNA altamente conservado), da qual muitos são reguladores chave no desenvolvimento embrionário (128). Localizado em 9q22, este gene apresenta apenas um exon codificante de uma proteína de 373 aminoácidos (hg18), representado na figura abaixo.

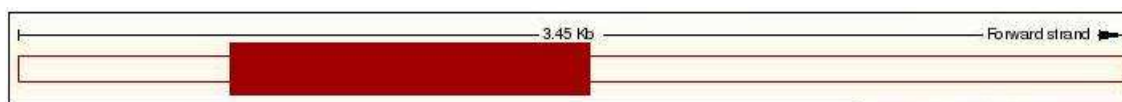


Figura 5. Estrutura do gene *FOXE1*: um exon parcialmente traduzido ressaltado em vermelho (código do *Ensembl Genome Browser* ENST00000375123 [hg18]).

A expressão deste gene foi observada na tireóide e na glândula pituitária anterior de ratos (128), e no epitélio das proeminências nasais mediais e proeminências maxilares (129). A partir da

análise de embriões humanos e tecidos fetais, observou-se a expressão do gene *FOXE1* nos primórdios da tireóide, no epitélio orofaríngeo e timo (130).

Camundongos com ausência de expressão do gene *Foxe1* (*Foxe1-null*) exibem FP e também tem falta ou posição anormal da tireóide (131). Recentemente, o papel do gene *FOXE1* no controle da expressão dos genes *MSX1* e *TGF- β 3* e, conseqüentemente, na palatogênese, foi observado em experimentos com camundongos deficientes para este gene, que apresentaram redução drástica da expressão dos genes *Msx1* e *Tgf- β 3* nas prateleiras palatinas antes da fusão das mesmas (132).

Mutações no gene *FOXE1* foram descritas em pacientes que, em comum, apresentavam FP e agenesia de tireóide (56, 57, 133), e também em um indivíduo com FL/P não-sindrômica (58). A associação e/ou a ligação deste gene mostraram-se significativas em casos de FL/P ou FP não-sindrômica (59, 129).

Gene *GLI2*

O gene *GLI2* (*GLI family zinc finger 2*), mapeado em 2q14, pertence a uma família de genes do tipo *zinc-finger* (134). Pela construção genômica NCBI36 (hg18), este gene apresenta quatro transcritos diferentes, por mecanismo de *splicing* alternativo. A figura 6 mostra a representação esquemática do gene, com nove exons traduzidos que codificam uma proteína de aproximadamente 1257 resíduos.

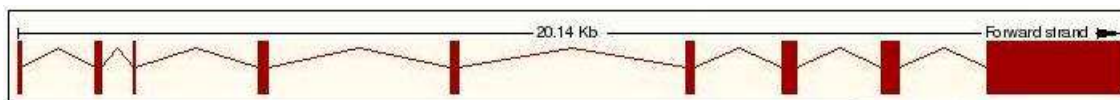


Figura 6. Estrutura do gene *GLI2*: os nove exons traduzidos estão destacados em vermelho (código do *Ensembl Genome Browser* ENST00000341310 [hg18]).

Os genes *GLI1*, *GLI2* e *GLI3* apresentam expressão em vários tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica e também nas células da crista neural (135). Alterações no sítio de fosforilação do gene *Gli2* causam, em camundongos, defeitos do tubo neural e anomalias craniofaciais (136). A presença de anomalias esqueléticas, FP, dentes anômalos e alterações de membros em camundongos mutantes para o gene *Gli2* ressaltam o papel deste como um dos fatores de transcrição envolvidos na expressão do gene *SHH* em vertebrados (60).

Mutações no gene *GLI2* são comumente encontradas em indivíduos com espectro de holoprosencefalia associada à FL/P (137, 138, 139). Entretanto, alterações neste gene também foram encontradas em indivíduos com quadro de FL/P e alterações hormonais da glândula pituitária (140), indivíduos com alterações craniofaciais e FL ou FL/P (141) e portadores de FL/P não-sindrômica (58).

Gene *MSX2*

O gene *MSX2* (*msh homeobox 2*), localizado em 5q35.2, pertence a uma família de genes do tipo *homeobox* (142). Este gene apresenta dois exons parcialmente traduzidos (Figura 7) que codificam uma proteína de aproximadamente 267 aminoácidos (hg18).

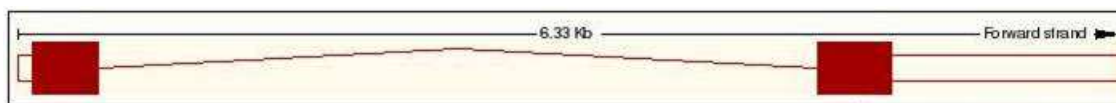


Figura 7. Estrutura do gene *MSX2*: dois exons com as porções traduzidas destacadas em vermelho (código do *Ensembl Genome Browser* ENST00000239243 [hg18]).

Modelos animais mutantes para este gene apresentam alterações de ossificação do crânio (143) e fenótipo de craniossinostose (144). Ratos portadores da mutação P148H apresentam hipoplasia mandibular, FP, exencefalia e fenda facial mediana (71). Mutações nesse gene foram

descritas em pacientes com craniossinostose (145, 146) e em indivíduos com FL/P não-sindrômica (58).

Gene *SKI*

O gene *SKI* (*V-SKI avian sarcoma viral oncogene homolog*), classificado como um proto-oncogene, foi descoberto por sua homologia ao oncogene viral de sarcoma aviário (147). Mapeado na região 1p36, apresenta sete exons traduzidos (figura 8) que codificam uma proteína de 728 resíduos.

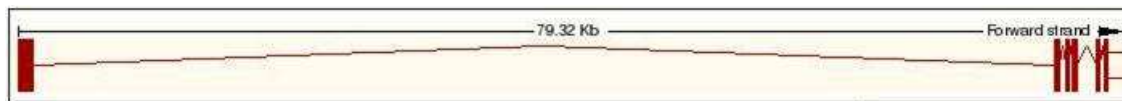


Figura 8. Estrutura do gene *SKI*: sete exons traduzidos destacadas em vermelho (código do *Ensembl Genome Browser* ENST00000378536 [hg18]).

A função de repressão deste gene sobre a sinalização do gene *TGF-beta* (148, 149) e sua participação no desenvolvimento do tubo neural e na diferenciação muscular (150, 151) são conhecidas. Trabalhos com modelos animais demonstraram que o gene *Ski* é essencial para o desenvolvimento embriológico geral, já que camundongos com ausência deste gene (*Ski* $-/-$) apresentam altos índices de letalidade perinatal, além da ocorrência de alterações como hipertrofia muscular, maxila anormal, fenda facial variando de fenda facial frontonasal completa a fenda mediana nasal e labial e defeitos de tubo neural. Estes trabalhos também evidenciaram que a correta expressão deste gene é necessária para a morfogênese da face e do cérebro (88, 89).

A deleção do gene *SKI* em indivíduos com a síndrome de deleção 1p36 sugere a contribuição do mesmo para o fenótipo desta síndrome, particularmente para a presença de fenda facial (89). Okamoto et al. (152) descrevem uma criança com deleção na região 1p36 envolvendo o gene *SKI* apresentando cardiopatia congênita, hipotonia e alterações faciais como microcefalia,

hipertelorismo, hipoplasia facial e deformação nasal com FL. A presença de uma mutação neste gene em um indivíduo americano com FL/P e a associação deste gene com FL/P na população filipina foram descritas por Vieira et al. (58). O *locus* deste gene também apresentou evidências de ligação em famílias com FL/P ou FP não-sindrômica de origem européia (153).

Gene *SATB2*

Os genes *SATB2* (*special at-rich sequence-binding proteinsat 2*) e *SATB1* constituem uma classe diferenciada de genes do tipo *homeobox* (84). Localizado na região 2q33, o gene *SATB2* é composto de 13 exons dos quais 10 são traduzidos (Figura 9) que codificam uma proteína de 733 resíduos.

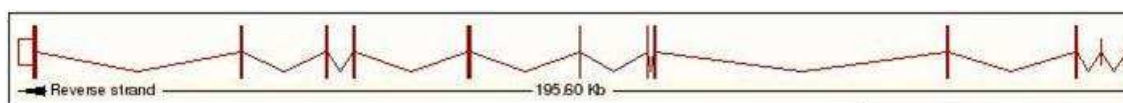


Figura 9. Estrutura do gene *SATB2*: 10 exons traduzidos destacadas em vermelho (código do *Ensembl Genome Browser* ENST00000260926 [hg18]).

Este gene tem importante papel durante a diferenciação do córtex neuronal, especificamente pela função de modulação da estrutura da cromatina (85, 154, 155). Sua expressão foi observada predominantemente no cérebro e nos rins e, em menor escala, no timo e testículos (86), nas prateleiras palatinas (84) e nas proeminências frontonasal, maxilar e mandibular (85).

Camundongos mutantes para o gene *Satb2* exibem alterações craniofaciais incluindo micrognatia, microcefalia, FP e alterações na diferenciação óssea (85, 86). Fenótipo semelhante é visto em humanos com alterações neste gene. Deleções envolvendo o gene *SATB2* foram associadas a pacientes com quadro dismórfico, FP, dificuldades de aprendizado e atraso no

crescimento (156, 157). Mutações de sequência no gene *SATB2* foram descritas em pacientes com fenótipo de FP, assimetria mandibular e retardo mental (158), e em um paciente com FL/P não-sindrômica (58).

Gene *SPRY1*

O gene *SPRY1* (*sprouty homolog 1*), mapeado em 4q28.1, apresenta dois transcritos diferentes, ambos com dois exons (hg18), sendo que apenas um deles codifica uma proteína de 319 aminoácidos (Figura 10).

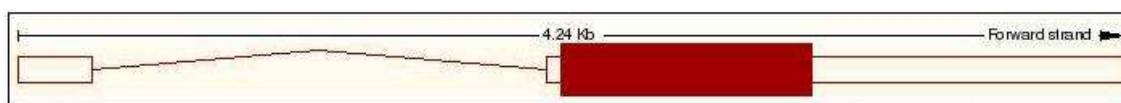


Figura 10. Estrutura do gene *SPRY1*: um exon traduzido destacado em vermelho (código do *Ensembl Genome Browser* ENST00000394339 [hg18]).

Por processos de clonagem, três genes homólogos em humanos foram identificados: *SPRY1*, *SPRY2* e *SPRY3* (159). A proteína SPRY desempenha um papel de antagonista (inibidora) dos fatores de crescimento de fibroblasto (FGF) (159, 160, 161). A expressão do gene *Spry1* é vista na crista neural, face, membros, dentes e pulmões, (162, 163) e o padrão mutante deste gene em ratos resulta em fenda facial, FP, alterações durante a formação nasal e ossos frontais, como também defeitos cardiovasculares (90). Em humanos, até o momento, não foram descritas mutações nesse gene.

Gene *MSX1*

O gene *MSX1* (*msh homeobox 1*), localizado em 4p16.2, pertence a uma família de genes do tipo *muscle segment homeobox* (142). Este gene apresenta dois transcritos diferentes, ambos com dois exons parcialmente traduzidos (hg18) que codificam uma proteína de 303 resíduos aminoácidos (Figura 11).

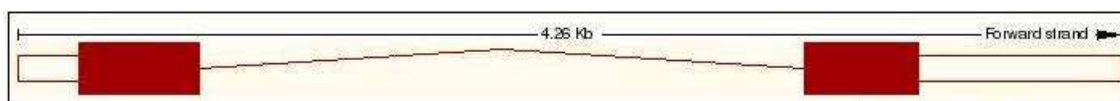


Figura 11. Estrutura do gene *MSX1*: dois exons com suas porções traduzidas destacadas em vermelho (código do *Ensembl Genome Browser* ENST00000382723 [hg18]).

O nome desta família de genes deriva do conhecido papel destes na miogênese embrionária (164, 165). Modelos animais com ausência do gene *Msx1* apresentam FP, anomalias craniofaciais, anomalias do desenvolvimento dentário (68) e alterações na ossificação dos ossos cranianos (166). A expressão deste gene é observada no mesênquima das prateleiras palatinas em desenvolvimento e é necessária para a correta expressão dos genes *Bmp4*, *Bmp2* e *Shh* (167). A ocorrência de FP em camundongos mutantes evidenciou a interação entre os genes *Pax9* e *Msx1* durante o desenvolvimento do lábio superior (168). Além destas, a interação entre os genes *MSX1* e *IRF6* (169) e a modulação do gene *MSX1* pelo gene *SUMO1* (170) foram descritas.

Mutações no gene *MSX1* foram relatadas por vários autores em casos de FL/P ou FP não-sindrômica (58, 109, 111, 112, 171), em famílias segregando FL/P e FP com agenesia dentária (14) e em famílias com hipodontia e FL/P (172). Existem, ainda, evidências da ligação e de associação deste gene com FOT (107, 173).

Genes *FGF8* e *FGFR1*

A família dos fatores de crescimento de fibroblastos (*FGF1–FGF10* e *FGF16–FGF23*) apresenta alta homologia na estrutura gênica e na sequência de aminoácidos entre as espécies de mamíferos. Os *FGFs* possuem alta afinidade pelo sulfato de heparina, necessária para a ligação e ativação dos receptores de *FGFs*. Existem sete receptores de tirosino-quinases principais, codificados por quatro genes (*FGFR1–FGFR4*), que interagem com os *FGFs* e desempenham um importante papel durante o desenvolvimento embrionário (54, 174).

O gene *FGF8* (*fibroblast growth factor 8*), mapeado em 10q24, é composto por seis exons traduzidos (Figura 12) e codifica uma proteína de 244 resíduos (hg18).

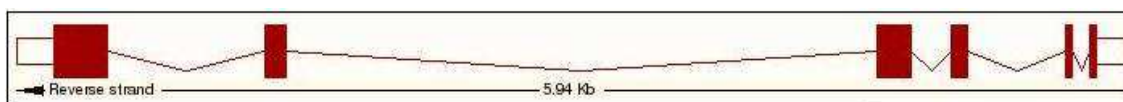


Figura 12. Estrutura do gene *FGF8*: seis exons com suas porções traduzidas destacadas em vermelho (código do *Ensembl Genome Browser* ENST00000320185 [hg18]).

O gene *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor 1*), localizado em 8p11.2, apresenta 11 transcritos diferentes, por mecanismo de *splicing* alternativo. Este gene possui 18 exons (Figura 13) dos quais 17 codificam a proteína de 822 aminoácidos.

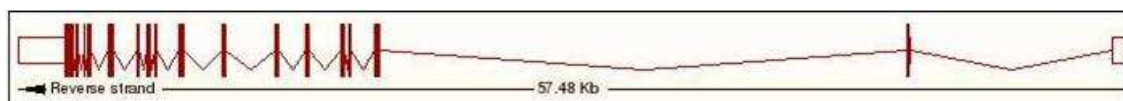


Figura 13. Estrutura do gene *FGFR1*: 17 exons traduzidos destacadas em vermelho (código do *Ensembl Genome Browser* ENST00000341462 [hg18]).

O padrão têmporo-espacial de expressão do gene *FGF8* sugere seu envolvimento na gastrulação, desenvolvimento do cérebro e do coração, organogênese dos membros, face e lábio, na esqueletogênese e palatogênese (51, 52, 53, 175, 176, 177, 178, 179, 180). Com relação ao

gene *FGFR1*, sabe-se de seu papel na ossificação craniana, no desenvolvimento das estruturas craniofaciais e na palatogênese (181, 182, 183).

A síndrome de Kallmann caracterizada por hipogonadismo, surdez, sindactilia, FL/P e agenesia dental está relacionada principalmente a mutações no gene *FGFR1* (55, 184, 185). Entretanto, tem se relatado também o envolvimento do gene *FGF8* em casos desta síndrome (186, 187, 188, 189). Mutações no gene *FGFR1* são frequentes em casos de craniossinostose (190, 191, 192). Além disso, mutações também foram encontradas em casos de FL/P e FP não-sindrômica (54) e, no gene *FGF8*, em casos de FL/P não-sindrômica (54, 193).

Gene *P63*

O gene *P63* (*tumor protein p63*) codifica um fator de transcrição que pertence à família do gene *TP53* (194, 195). Localizado em 3q28, este gene apresenta sete transcritos diferentes, sendo composto 14 exons traduzidos (Figura 14) codificantes de uma proteína de 680 resíduos (hg18).

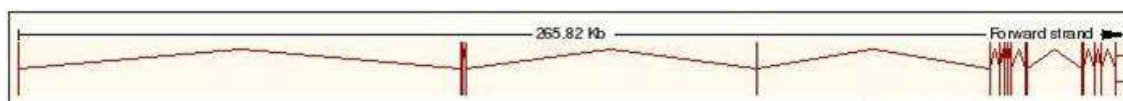


Figura 14. Estrutura do gene *P63*: 14 exons traduzidos destacados em vermelho (código do *Ensembl Genome Browser* ENST00000264731 [hg18]).

O gene *P63* é altamente expresso nas células da pele, língua, glândulas mamárias e esôfago. Durante o desenvolvimento embrionário de ratos, a expressão deste gene é observada nas células progenitoras da epiderme (196). Animais mutantes exibem defeitos nos membros, epiderme e defeitos craniofaciais, com destaque para presença de FL/P (197, 198). O espectro fenotípico das síndromes humanas causadas por mutações no gene *P63* é semelhante em

camundongos (72, 73, 74, 199, 200, 201, 202, 203). Poucos relatos de mutações neste gene foram associados a FL/P ou FP não-sindrômica (204, 205).

Como exposto, o padrão de expressão, os resultados de estudos de ligação e/ou associação e o fenótipo de modelos animais com mutações nos genes *IRF6*, *FOXE1*, *GLI2*, *MSX2*, *SKI*, *SATB2*, *SPRY1*, *MSX1*, *FGF8* e *FGFR1* evidenciam a importância da análise destes em casos de FOT, bem como a indicação de análise do gene *P63* em casos sindrômicos específicos.

2.6. Evolução das ferramentas de investigação: da citogenética clássica à citogenética molecular e biologia molecular

Nos últimos 50 anos, desde que o número correto de cromossomos da espécie humana foi descrito, inúmeras alterações cromossômicas têm sido associadas a doenças genéticas. As primeiras descobertas envolvendo cromossomos inteiros, tais como trissomia 21 e monossomia do X, deram início à citogenética clínica. Posteriormente, a introdução das técnicas de bandamento possibilitou a identificação de alterações cromossômicas estruturais, tais como deleções, translocações e inserções. Ainda, o aperfeiçoamento das preparações cromossômicas, incluindo as técnicas de alta resolução, melhorou significativamente o diagnóstico citogenético. Entretanto, mesmo com técnicas de alta resolução, não era possível a identificação de alterações cromossômicas menores que 4 Mb (206, 207).

O advento da citogenética molecular no final da década de 80, com a introdução da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (*FISH – Fluorescence in situ Hybridization*) (208), permitiu a caracterização de rearranjos cromossômicos de origem desconhecida e a identificação de várias síndromes de microdeleção em indivíduos com fenótipos específicos, como exemplo as Síndromes Velocardiofacial, Prader-Willi, Angelman e Williams. Porém, a principal limitação desta técnica é a necessidade de se saber qual *locus* deve ser testado, baseado em uma hipótese diagnóstica, visto que apenas um ou poucos *loci* podem ser testados por experimento (207, 209).

A necessidade de se avaliar o genoma todo em um único experimento levou ao desenvolvimento de outras técnicas baseadas em hibridação com fluorescência, como *FISH* multicolor (*M-FISH*) e cariotipagem espectral (*SKY*), utilizadas principalmente para a detecção de alterações balanceadas, e a hibridação genômica comparativa (*CGH – Comparative Genomic Hybridization*), que permite identificar ganhos e perdas de segmentos cromossômicos com uma resolução de 5 – 10 Mb (210). A baixa resolução levou ao desenvolvimento da técnica de *CGH* baseada em *arrays* (*array-CGH*) capaz de analisar o genoma todo em único experimento com resolução muito maior que a *CGH* clássica (207), considerada uma das revoluções na área da genética (211).

O princípio da técnica de *array-CGH* é similar ao empregado na técnica de *CGH* convencional, sendo duas amostras de DNA marcadas em diferentes cores fluorescentes e co-hibridadas, não mais em metáfases normais como na *CGH*, mas em sequências de DNA fixadas em uma lâmina. Esta técnica foi descrita primeiramente por Solinas-Toldo et al. (212) e Pinkel et al. (213), que demonstraram ser esta uma eficiente ferramenta para a detecção de desequilíbrios genômicos no DNA humano. A técnica de *array-CGH* foi empregada largamente no diagnóstico de pacientes com retardo mental e (ou) anomalias congênitas múltiplas (214, 215, 216, 217).

Posteriormente, diferentes grupos trabalharam no aperfeiçoamento da produção de *arrays* e dos protocolos de hibridação e análise dos resultados (218, 219). Estes protocolos aplicados à clínica revelaram, em pacientes com translocação equilibrada por cariótipo, alterações cromossômicas submicroscópicas relevantes em um dos pontos de quebra (220, 221, 222).

Inicialmente, os trabalhos utilizavam *arrays* de BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*). Atualmente, diversos tipos de *arrays* já foram desenvolvidos e estão disponíveis comercialmente. A maioria destes é produzida com oligonucleotídeos, o que aumentou consideravelmente a resolução e reprodutibilidade dos experimentos. Os *arrays* diferem principalmente na cobertura que oferecem do genoma (dependendo do número e espaçamento entre os oligonucleotídeos no *array*), no tamanho dos oligonucleotídeos e no tipo de análise. Com relação aos procedimentos de

hibridação, os *arrays* diferem em hibridação comparativa e hibridação apenas da amostra teste, sendo o último denominado de técnica de hibridação genômica em *arrays* (*aGH*). Cada plataforma tem suas vantagens e desvantagens, e a escolha dos *arrays* depende dos objetivos específicos de cada estudo (223).

2.6.1. Variações do genoma humano

As variações do genoma humano apresentam-se de várias formas, desde variações cromossômicas microscopicamente visíveis a alterações em um único nucleotídeo (*SNP*). Os *SNPs* são caracterizados por mutações de ponto que alteram um nucleotídeo por outro numa mesma posição do genoma (alelos) e que possuem uma frequência maior que 1% na população humana (224). O número estimado de *SNPs* no genoma humano, conforme última atualização da base de dados *dbSNP* do *NCBI* (*ENTREZ SNP*), é de 23 milhões. Os estudos sobre a importância e o papel dos *SNPs*, principalmente os não-sinônimos, na susceptibilidade a doenças ou sobre a relação destes com o desenvolvimento de síndromes genéticas são inúmeros e ganharam maior embasamento com os resultados das pesquisas do consórcio internacional *HapMap* (225).

A utilização das técnicas de *array* para a análise de indivíduos fenotipicamente normais levou à descoberta de extensos rearranjos genômicos, compreendendo deleções ou duplicações que variam em tamanho de alguns Kb a até 1Mb. Estas alterações foram denominadas variação no número de cópias de segmentos de DNA do genoma humano (do inglês *Copy Number Variations* – *CNV*) (226, 227). Em aproximadamente 12% do genoma humano, mais de mil *CNVs* foram caracterizadas pela abundância de sequências funcionais (228, 229). Dados mais recentes de 2010 da *Database of Genomic Variants* (*DGV*) relatam a ocorrência de *CNVs* em mais de 15.000 *loci* genômicos.

As variações genômicas, incluindo as *CNVs*, podem ocasionar variações fenotípicas que estão dentro da normalidade (230) ou também condições patogênicas. As *CNVs* podem afetar a dosagem de um gene, alterar a expressão gênica (como, por exemplo, *CNVs* que afetam genes que

codificam fatores de transcrição) ou causar a interrupção da sequência gênica codificante (229, 231, 232). Assim, caracterizar as variações no DNA que contribuem para o desenvolvimento de uma doença ou síndrome se tornou um dos principais objetivos da genética humana. Identificar os *loci* envolvidos requer a avaliação, em larga escala, das variações na sequência do DNA genômico.

2.6.2. Investigação de CNVs na gênese das FOTs: importância das técnicas de *array*

As técnicas de *array* mostraram extensa aplicação, incluindo a caracterização com alta resolução de alterações cromossômicas humanas, a identificação de desequilíbrios genômicos em diversos grupos de pacientes até então sem diagnóstico, a descrição de novas síndromes de microdeleção, e até mesmo a descoberta de novos genes envolvidos em doenças. No caso das FOTs, evidenciou ainda mais a complexidade genética envolvida na etiologia desse grupo de anomalias craniofaciais.

Em um dos primeiros trabalhos com a metodologia de *array-CGH*, CNVs em indivíduos com FOT síndrômica e não-sindrômica foram identificadas (233). Dentre os casos síndrômicos, uma deleção *de novo* de 2,7Mb na região 22q11.2 foi detectada em um indivíduo clinicamente não diagnosticado como portador de uma das síndromes de deleção 22q11.2. Em cinco de 18 pacientes com fenótipo da SVW foram encontradas deleções na região 1q32.2, incluindo o gene *IRF6*. Dentre os casos não-sindrômicos, foi encontrada uma deleção *de novo* de 3,2Mb na região 6q25.1–25.2 em um indivíduo com FL/P e em um indivíduo com FL foi encontrada uma deleção de 2,2Mb na região 10q26.11–26.13 de herança materna (mãe com FL). Os genes *ESR1* e *FGFR2* localizados respectivamente nas regiões 6q25.1–25.2 e 10q26.11–26.13 foram apontados como genes candidatos responsáveis pelo fenótipo observado. Por meio dos resultados encontrados, Osoegawa et al. (233) puderam concluir que a técnica de *array-CGH* é um método eficiente para a identificação de novos *loci* cromossômicos e genes candidatos para FOTs.

Estudos posteriores descreveram CNVs envolvendo genes apontados como possivelmente responsáveis pela ocorrência de FOT em pacientes com quadros síndrômicos. A deleção de 800kb

na região 19q13.32 evidenciou o gene *SAE1*, já que este tem função de atividade enzimática junto ao gene *SUMO1* (234). Os genes *DLX1/DLX2* foram apontados como candidatos em um caso de deleção em 2q31.1 (235). Ambos codificam fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento craniofacial (236). Deleções na região 20p12.3, envolvendo o gene *BMP2* expresso no mesênquima palatal (237, 238), foram encontradas em quatro paciente com FP (239). Já em um estudo com FOT não-sindrômica, a aplicação da técnica de *array* confirmou as deleções nos genes *TBX1* e *TFAP2A*, consideradas potencialmente patogênicas (240).

A aplicação das técnicas de *array* também tem se mostrado importante para o melhor delineamento de casos de translocações cromossômicas. Dave et al. (241) descreveram um família segregando uma translocação t(14;21)(q21.2;q21.2) em que a técnica de *array-CGH* permitiu a caracterização com maior precisão dos pontos de quebra nos indivíduos com translocação equilibrada; e também a detecção de um segmento duplicado em 14q21 e um segmento deletado em 21q21, derivados da translocação, nos indivíduos com anomalias fenotípicas, sendo um deles portador de FP, alterações faciais e retardo do desenvolvimento. Também utilizando *array-CGH*, as alterações derivadas de uma translocação (3;22) puderam ser investigadas em um paciente com quadro de FL/P sindrômica (242). A deleção de ~8Mb em 3p25.3-pter e de ~3Mb em 22q11.1 são condizentes com o genótipo observado. Já no caso de uma translocação complexa t(1;10;5)(q32;p12;q31), a técnica de *array* confirmou que o desequilíbrio ocorreu apenas em um dos cromossomos envolvidos (deleção 10p). O paciente apresentava FL/P, dismorfismos faciais e retardo mental (243).

Tendo em vista a complexidade dos fatores genéticos envolvidos na etiologia das FOTs, este estudo buscou contribuir no entendimento da gênese deste grupo de defeitos congênitos aplicando diferentes abordagens laboratoriais.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Este projeto teve como objetivo geral investigar os fatores genéticos envolvidos na etiologia das FOTs em um grupo de pacientes síndrômicos e não-síndrômicos.

3.2. Objetivos específicos

1. Investigar a presença de *CNVs*, por meio da técnica de *aGH*, em indivíduos com FOT síndrômica ou não-síndrômica.
2. Comparar *CNVs* detectadas com os genitores e familiares dos indivíduos afetados.
3. Investigar a presença de mutações nos genes *IRF6*, *FOXE1*, *GLI2*, *MSX2*, *SKI*, *SATB2*, *SPRY1*, *MSX1*, *FGF8* e *FGFR1* por meio de sequenciamento direto.
4. Investigar casos específicos por meio de análises complementares.

CASUÍSTICA

4. Casuística

O convite para participação neste estudo foi realizado para as famílias e indivíduos cadastrados no Projeto Crânio-face Brasil atendidos no Ambulatório de Dismorfologia Craniofacial do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp); um caso foi proveniente do Serviço de Genética Clínica do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes – HUPAA/Universidade Federal de Alagoas (Maceió-AL) e um outro caso do Departamento de Genética Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto –FAMERP (São José do Rio Preto-SP).

A avaliação clínica, realizada por médico geneticista, seguiu a rotina padrão dos serviços, constando de: anamnese específica com coleta de dados gestacionais e pessoais, levantamento da história familiar, exame físico e coleta de sangue para realização do exame de cariótipo (bandamento G). Em dois casos (paciente 9 e 21) foram identificadas alterações cromossômicas estruturais.

A casuística contabilizou 23 indivíduos portadores de FOT (13 do sexo masculino e 10 do sexo feminino). Conforme os aspectos embriológicos (FL/P e FP) e apresentação clínica (síndrômico e não síndrômico), os casos foram divididos em 4 grupos:

Grupo 1: 13 casos de FL/P síndrômica, familiar ou esporádica (1 caso com recorrência familiar)

Grupo 2: 6 casos de FL/P não síndrômica, familiar ou esporádica (2 casos com recorrência familiar)

Grupo 3: 3 casos de FP síndrômica, sendo todos esporádicos

Grupo 4: 1 caso de FP não síndrômica com recorrência familiar

A descrição detalhada dos portadores e a classificação encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes com FOT.

ID	Sexo	Tipo de fenda	Grupo	Cariótipo	Aspectos faciais e cranianos	Outros achados
1	F	FL/P	1	46, XX	Occipital plano, implantação baixa dos cabelos na fronte, hipoplasia malar, orelhas de implantação baixa e dismórficas, sinofre, fendas palpebrais oblíquas para cima, narinas assimétricas, filtro labial longo e fino, úvula bífida	Pescoço alado, peito escavado, fôvea coccígea, espinha bífida, clinodactilia e sindactilia em mãos e clinodactilia e braquidactilia em pés, manchas puntiformes hipocrômicas difusas, hipotrofia muscular generalizada
2	M	FL	1	46, XY	Hisurtismo em fronte, implantação dos cabelos na nuca baixa, orelhas de implantação baixa e dismórficas, malformação auricular, fendas palpebrais oblíquas para cima	Escoliose, braquidactilia de membros superiores, criptorquidia, cardiopatia congênita
3	M	FL/P	1	46, XY	Pregas epicânticas	Mamilos hipoplásicos, aumento da distância intermamilar, prega palmar única completa direita e esquerda
4	F	FL	1	46, XX	Braquicefalia, occipital plano, frontal abaulado, hidrocefalia, glabella proeminente, implantação baixa das orelhas, hipertelorismo ocular, pregas epicânticas, base nasal alargada, retrognatismo	RDNPM, aumento da distância intermamilar, clinodactilia em mãos, pé plano
5	M	FL	1	46, XY	Implantação baixa das orelhas, fendas palpebrais oblíquas para baixo, base nasal alargada, retrognatismo	Aumento da distância intermamilar, mãos fendidas, pé torto congênito, hipoplasia de artelhos, hipotonia cervico-escapular, agenesia bilateral de tíbia, hipotonia muscular
6	M	FL/P	1	46, XY	Pregas epicânticas, fendas palpebrais oblíquas para baixo	Clinodactilia em mãos, esplenomegalia, cardiopatia, RDNPM
7	F	FL/P	1	46, XX	Occipital proeminente, frontal alto, implantação alta dos cabelos na fronte, face alongada, hipoplasia malar, hipertelorismo ocular, blefarofitalmia, atresia dos dutos lacrimais, hipoplasia maxilar	Pele fina com lesões eritemato-crostosas, cabelos finos, esparsos e quebradiços, dentes cônicos e deficiência auditiva progressiva

8	F	FL/P	1	46, XX	Orelhas de implantação baixa e dismórficas, face alongada, ptose palpebral, microcefalia, prognatismo	Cardiopatia congênita, RDNPM, distúrbios de comportamento, baixa estatura, hipoacusia neurossensorial profunda, escoliose
9	F	FL	1	46,XX, t(4;5) (p10;p10) pat, 9qh+pat, 16qh+mat [50]	Orelhas de implantação baixa, pregas epicânticas, fendas palpebrais oblíquas para cima, narinas assimétricas	Clinodactilia em mãos, assimetria de membros inferiores, alteração de pigmentação no torax, RDNPM
10	F	FL	1	46, XX	Macrocefalia, occipital plano, frontal alto e abaulado, implantação alta dos cabelos na fronte, orelhas de implantação baixa, orelhas com pits préauriculares, nariz bífido	--
11	F	FL/P	1	46, XX	--	RDNPM
12	M	FL/P	1	46, XY	Epicanto, orelhas de implantação baixa e dismórficas, pescoço curto	Fóvea sacral, braquidactilia em pés, clinodactilia em mãos, pregas interfalangeanas distais superficiais
13	M	FL/P	2	46, XY	--	--
14	M	FL	2	46, XY	--	--
15	M	FL	2	46, XY	--	--
16	M	FL e palatal submucosa	2	46, XY	--	--
17	M	FL	2	46, XY	--	--
18	M	FL/P	2	46, XY	--	--
19	F	FL	2	46, XX	--	--

20	M	FP	3	46, XY	Face alongada, cristas supraorbitais proeminentes, hipoplasia malar, ponte nasal baixa com ponta bulbosa, filtro curto e apagado, lábio superior fino, palato ogival	Tórax escavado, sindactilia em mãos e pés, pterígio em face posterior que se estende da metade da coxa até o calcâneo, cúbito valgo
21	M	FP submucosa	3	46,XY,ins (11;?) (p13;?) [20]	Orelhas dirmórficas, face alongada, hipertelorismo ocular, ptose palpebral, hipoplasia alar, nariz com ponta bífida, epicanto, estrabismo, nistagsmo, aniridia bilateral	Anomalia cardíaca (defeito no septo ventricular), RDNPM, hidronefrose
22	F	FP submucosa	3	46, XX	Desproporção crânio-facial, bossa frontal, hemangioma (frontal, nasal e lábio superior), raiz nasal achatada, filtro labial apagado, retrognatismo, orelhas de implantação baixa e dismórficas	Defeito de redução nos membros inferiores e superiores, agenesia de polegar, artrogripose em cotovelos e joelhos.sindactilia parcial entre 4º e 5º pododáctilos, hipoplasia de 5º dedos com clinodactilia, manchas mongólicas em dorso e glúteo, hipoplasia de grandes e pequenos lábios
23	F	FP	4	46, XX	--	--

Legenda. RDNPM: retardo do desenvolvimento neuropsicomotor; pat: paterna; mat: materna; t: tranlocação; ins: inserção.

Representação do grupo 1
Representação do grupo 2
Representação do grupo 3
Representação do grupo 4

Dentre os casos síndrômicos, o paciente 20 foi diagnosticado com suspeita da Síndrome Pterígeo Poplíteo e, o paciente 5, apresentou anomalias de membros incluindo mãos fendidas e FL, cujo diagnóstico diferencial com a síndrome EEC (do inglês *Ectrodactyly*, *Ectodermal dysplasia*, *Cleft lip/palate*) foi considerado. Os outros pacientes da amostra apresentavam FOT e outros sinais clínicos sem um padrão sugestivo de síndrome conhecida.

Para análise das *CNVs*, outros 46 indivíduos, entre genitores e familiares dos afetados foram incluídos no estudo. Para os casos esporádicos, foram coletadas amostras do afetado e seus genitores formando-se trios, com exceção dos casos 14 e 20 em que foram coletados apenas amostras do indivíduo afetado e de outros casos em que foram coletados apenas amostras do afetado e de sua mãe. Nos casos familiares, foram coletadas amostras dos afetados e também de indivíduos não afetados dentro da família.

Além disso, formou-se um grupo de 20 indivíduos controle da população do estado de São Paulo composto por indivíduos sem história de FOT em três gerações da família. Estes foram voluntários aceitos no estudo após realização de heredograma pela pesquisadora responsável ou colaboradores no estudo.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp (processo 714/2008) (Anexo I). Após a anuência do participante ou de seu responsável, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II).

MÉTODOS

5. Métodos

Neste estudo foram utilizadas as técnicas de *aGH* e sequenciamento automático. Para complementar a investigação de um caso específico, foram utilizadas as técnicas de *FISH* e *MLPA*.

O exame cariótipo e a *FISH* foram realizadas no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp.

As técnicas de *aGH*, *MLPA* e sequenciamento automático foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp.

As etapas finais da técnica de *aGH* (hibridação, lavagem e escaneamento) foram realizadas no Laboratório de Microarranjos do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas/SP).

5.1. Extração de DNA genômico

Foram coletados 10 ml de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 1,0 ml de EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico 2H₂O) 10% pH 8,0 como anti-coagulante. A extração de DNA das amostras foi feita seguindo dois procedimentos: por meio do kit comercial QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA) e através do método do fenol-clorofórmio descrito por Araújo et al. (244).

5.2. Técnica de *aGH*

Para a realização desta técnica foi utilizado o *GeneChip Genome-Wide Human SNP Array* 6.0 (Affymetrix®) e o kit de reagentes compatível *Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit* 5.0/6.0 (Affymetrix®), seguindo as recomendações do fabricante. Este *chip* contém mais de

906,600 *SNPs* baseados no *HapMap Project* utilizados para análise de perda de heterozigosidade nesse estudo, e mais de 946,000 sondas de oligonucleotídeos para detecção de *CNVs*.

O protocolo, com duração de cinco dias, se divide em 10 etapas que serão descritas resumidamente a seguir:

Dia 1

1. Diluição das amostras de DNA

As amostras foram diluídas com tampão TE com EDTA reduzido para a concentração de 50 ng/μl e volume de 10 μl.

2. Digestão das amostras com as enzimas *NspI* e *StyI*

Para cada amostra, foram feitas duas reações de digestão separadamente utilizando as concentrações recomendadas das enzimas de restrição (1 μl), tampões compatíveis (2 μl), BSA (0,2 μl) e água (11,55 μl). As reações foram processadas em um aparelho termociclador (Mastercycler Gradiente Eppendorf®) com um programa de ciclagem de 37°C 120 minutos; 65°C 20 minutos.

3. Reação de ligação com adaptadores para *NspI* e *StyI*

Em seguida, a reação de ligação utilizando adaptadores específicos (0,75 μl), tampão (2,5 μl) e enzima T4DNA *ligase* (2 μl) foi processada em aparelho termociclador (Mastercycler Gradiente Eppendorf®) com programa de ciclagem de 16°C 180 minutos; 70°C 20 minutos.

4. Amplificação dos fragmentos por PCR

As reações foram diluídas com 75 μl de água e, para cada amostra, 7 alíquotas de 10μl foram transferidas para uma nova placa. Em seguida, realizou-se a amplificação dos fragmentos digeridos pela técnica de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes

reagentes: água (39,5 µl), tampão específico (10 µl), G-C *Melt* (20 µl), dNTP (14 µl), primer (4,5 µl) e *TITANIUM Taq* (2 µl). O procedimento foi feito em aparelho termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf®) com um programa de ciclagem de 94°C 3 minutos; 94°C 30 segundos, 60°C 45 segundos, 68°C 15 segundos por 30 vezes; 68°C 7 minutos. Ao término da reação, realizou-se a eletroforese em gel de agarose 2% para verificação do padrão de fragmentos de 200 a 1100pb (Figura 15).

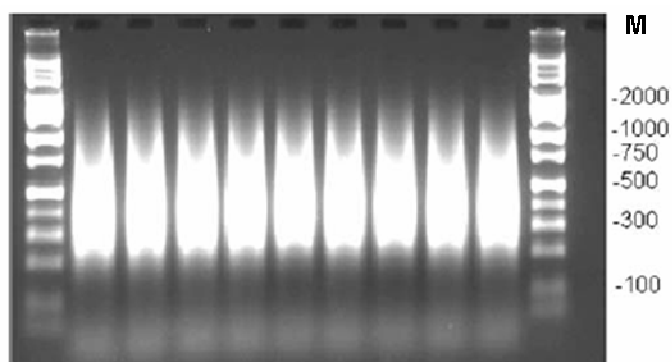


Figura 15. Exemplo do padrão dos produtos de PCR. Visualização em gel de agarose 2% (Fonte: manual *Genome Wide SNP Array 6.0*). M: marcador de peso molecular 100pb.

Dia 2

1. Purificação

Para a purificação das amostras amplificadas utilizaram-se reagentes como *beads magnéticas* e etanol em um procedimento baseado em repetidas centrifugações e uma “rack” magnética. Ao final, as amostras foram avaliadas quanto à concentração (ideal entre 4500 a 7000 ng/µl) e a pureza foi observado pelas relações de absorbância (A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0 e $A_{320} < 0,1$).

Dia 3

1. Fragmentação

Para a fragmentação dos produtos amplificados as concentrações recomendadas de água (6,45 µl), tampão específico (0,75 µl) e enzima *DNAase* de fragmentação (0,3 µl) foram

adicionadas. Em um aparelho termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf®) com programa de ciclagem de 37°C 35 minutos; 95°C 15 minutos, deu-se o processamento. Ao término da reação, a eletroforese em gel de agarose 3% verificou o padrão de fragmentos menores que 180pb (Figura 16).

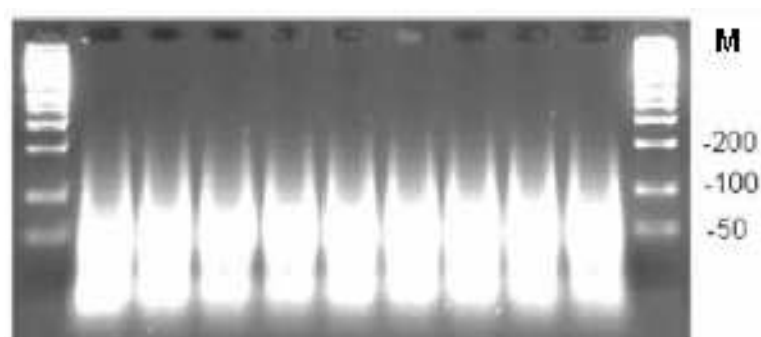


Figura 16. Exemplo do padrão dos produtos da fragmentação. Visualização em gel de agarose 3% (Fonte: manual *Genome Wide SNP Array 6.0*). M: marcador de peso molecular 50pb.

2. Pré-marcação do DNA

Logo em seguida, a reação de preparação para marcação foi feita utilizando as concentrações recomendadas tampão TdT (14 µl), DNA *Labeling Reagent* (2 µl) e enzima TdT (3,5 µl) e através de um aparelho termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf®) com um programa de ciclagem de 37°C 4 horas; 95°C 15 minutos.

Dia 4

1. Hibridação

Adicionou-se às reações um mix de hibridação composto de nove reagentes: *MES* (12 µl), *denhardt's solution* (13 µl), EDTA (3 µl), HSDNA (3 µl), OCR (2 µl), Human Cot-1 DNA (3 µl), tween-20 (1 µl), DMSO (13 µl) e TMACL (140 µl). Em seguida, foi feita a desnaturação em aparelho termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf®) a 95°C por 10 minutos. As amostras,

aplicadas aos *chips*, foram colocadas no forno de hibridação por 16 horas (temperatura 50°C e rotação 60 rpm).

Dia 5

1. Lavagem

Após a hibridação, os *chips* passaram pela estação de lavagem (*GeneChip Fluidics Station* 450, Affymetrix®) que realiza automaticamente um processo de injeção de soluções para remover resíduos em excesso.

2. Escaneamento

Por fim, os *chips* foram escaneados pelo *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix®).

5.2.1. Análise dos dados

5.2.1.1. Qualidade dos experimentos

A análise das imagens escaneadas de cada *chip* foi feita através do programa *GeneChip® Operating software* (GCOS) (Affymetrix®). Nesta análise visual, é possível verificar o padrão das sondas controle dispostas nas extremidades de cada *chip* a fim de se verificar a qualidade da hibridação do experimento.

Pelo programa *Genotyping Console®* (Affymetrix®) dois parâmetros, o *call rate* e o *contast qc* (CQC), permitem o acesso aos padrões de qualidade. A eficiência da genotipagem de cada experimento de *array* é indicada pelo *call rate*. O valor mínimo aceito de *call rate* é de 86%, segundo o fabricante do *chip*. O índice CQC mede a intensidade dos picos dos alelos dos *SNPs* genotipados em forma de um gráfico. Amostras com alta qualidade produzem gráficos com picos bem definidos e separados. Tais dados também podem ser verificados pela média do CQC, que deve ser maior que 1,7.

5.2.1.2. Análise das CNVs

Os softwares *Genotyping Console* 4.0 (Affymetrix®) e *Nexus Copy Number* 5.1 (BioDiscovery®) foram utilizados para o cálculo da intensidade de hibridação das sondas com o objetivo de analisar o número de cópias de cada *locus* gênico.

O programa *Genotyping Console* 4.0 (Affymetrix®) calcula a presença de CNVs baseado no algoritmo matemático *Birdseed*. Primeiramente, foi criado um arquivo de referencia de CNVs com os dados da genotipagem dos 20 indivíduos controle da população brasileira. Em seguida, cada caso teve seu perfil de CNVs determinado por comparação da intensidade de sinal das sondas contra o grupo de referência.

Os dados foram observados em forma de gráfico contendo *log2 ratio* e *cstate* (CN). O *cstate* se refere ao número de cópias de cada região, sendo: CN=2 região com número normal de cópias; CN>2 (CN=3 ou CN=4) região com duplicação; e CN<2 (CN=1 ou CN=0) região com deleção. Foi delimitado que apenas as CNVs maiores que 100kb seriam visualizadas através de uma tabela gerada pelo software contendo os resultados dos *cstates*. Entretanto, para os genes de interesse desse estudo realizou-se uma análise mais detalhada através da visualização dos gráficos de *log2 ratio* e *cstate* para observação de alterações menores que 100kb.

Já o programa *Nexus Copy Number* 5.1 (BioDiscovery®) calcula o número de cópias a partir de algoritmos baseados em Cadeia de Markov Oculta e em CBS (*circular binary segmentation*). Neste programa, os dados do projeto *HapMap* foram utilizados como referência para comparação com os dados das amostras. Dados de *log2 ratio* também são gerados e visualizados em gráficos.

Cada região de CNV foi avaliada quanto à presença de genes, descrição em indivíduos controle e descrição em indivíduos com fenótipo anormal através de pesquisa nas seguintes bases de dados:

- *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org>)
- *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

- *Database of Genomic Variants (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation>)*
- *UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>)*
- *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER, <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>)*

Considerando os resultados laboratoriais e as pesquisas em base de dados, a relevância das *CNVs* (> 100kb) encontradas foi baseada em determinados parâmetros (Figura 17), conforme adaptação dos métodos de análise propostos em publicações anteriores (245, 246, 247, 248, 249):

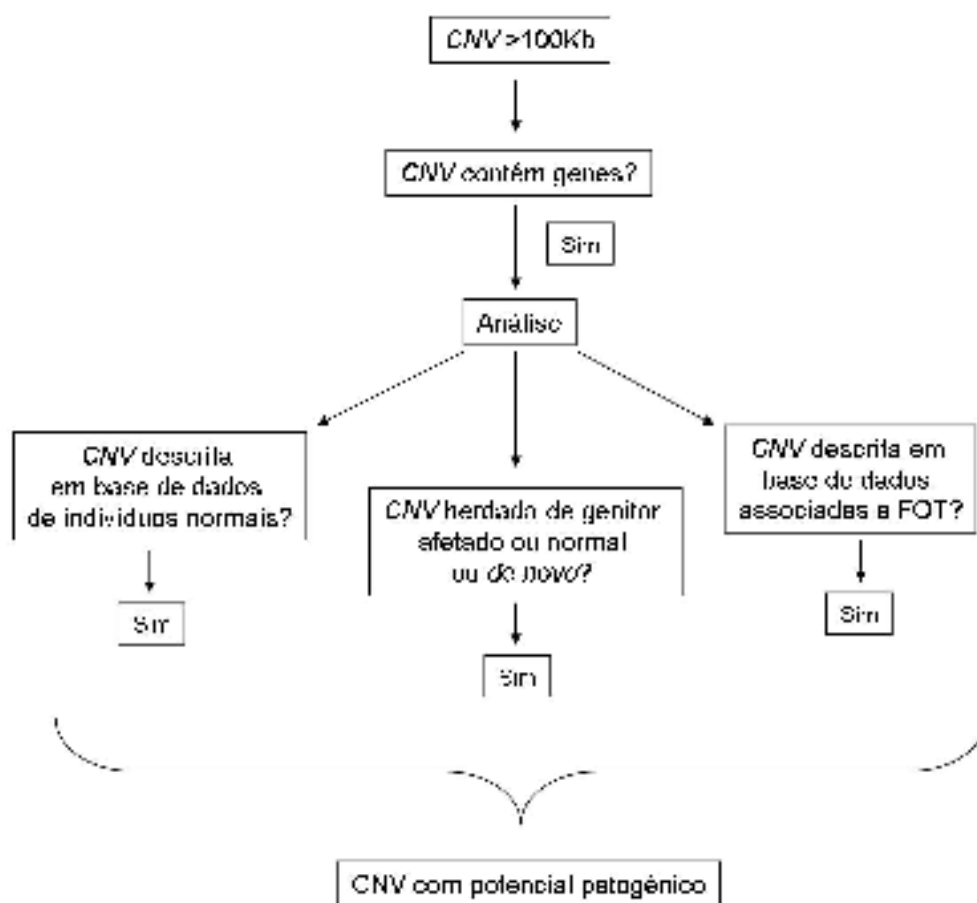


Figura 17. Fluxograma com os parâmetros considerados para a análise de *CNVs*.

5.3. Triagem de mutação dos genes candidatos

5.3.1. Desenho dos oligonucleotídeos

Para a confecção dos pares de oligonucleotídeos, utilizados na amplificação dos genes candidatos, o programa *Gene Runner* (Hastings Software Inc., Hastings, NY, USA) foi escolhido, seguindo as seguintes recomendações de Mc Pherson e Moller (250):

- Tamanho de 18-30 nucleotídeos
- Sequências não capazes de formar estruturas secundárias
- Pares de *primers* com temperaturas de anelamento semelhantes

As sequências de referência para a confecção dos oligonucleotídeos e a delimitação dos fragmentos de interesse foram retiradas da base de dados *Ensembl Genome Browser* segundo a construção genômica hg18 (*Human Genome Building* NCBI36).

Os fragmentos de interesse analisados destes genes foram todos os exons transcritos e traduzidos, com exceção do gene *FGFR1* em que apenas três exons previamente descritos com mutações em casos de FL/P não sindrômica (54) foram analisados. Deste modo, mutações nas regiões 5'UTR (região não traduzida) que poderiam afetar a transcrição gênica ou mutações em regiões intrônicas não foram avaliadas.

5.3.2. Amplificação dos fragmentos de interesse

A partir do DNA genômico, a técnica de PCR foi realizada para amplificação dos fragmentos de interesse, sendo analisados todos os exons traduzidos e as junções exon-intron de cada gene. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1%.

Para a padronização da amplificação dos fragmentos de interesse, foram utilizados protocolos básicos e ciclos de temperatura já anteriormente estabelecidos em nosso laboratório,

variando apenas a quantidade de cloreto de magnésio e DMSO₄. O protocolo para uma reação incluiu tampão (10X), MgCl₂ (25 µM), dNTP (2 µM), *primers* (5 pmoles), DMSO₄, *Taq* DNA Polimerase (5 U), DNA (200 ng/µL) e água até completar o volume final de 15 µL. No caso de determinados fragmentos ricos em pares de base GCs, as reações de amplificação foram padronizadas utilizando o kit *Taq* DNA Polymerase (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA). Este kit possui o reagente *Q-solution*, aditivo utilizado para melhorar a reação de PCR.

As sequências dos oligonucleotídeos, o tamanho dos fragmentos e as temperaturas padronizadas para amplificação de cada gene estão descriminados no anexo III.

Os programas de ciclagem de temperatura, *touchdown* e gradiente, utilizados para amplificação dos fragmentos estão esquematizados nas figuras 18 e 19.

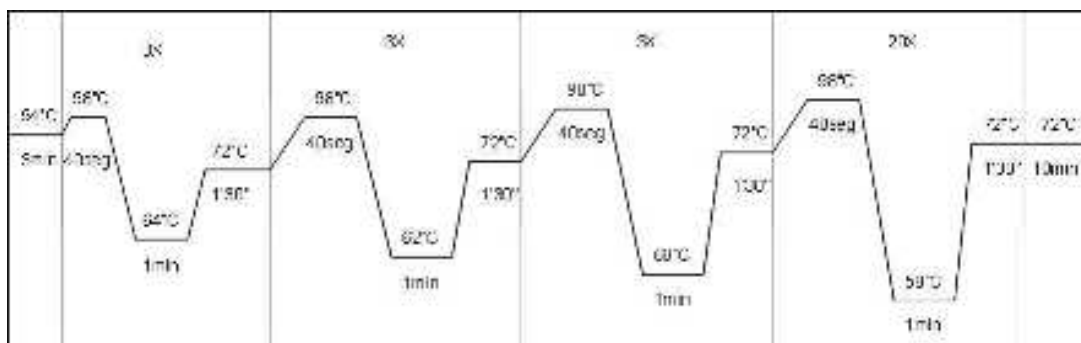


Figura 18. Ciclo *touchdown*.

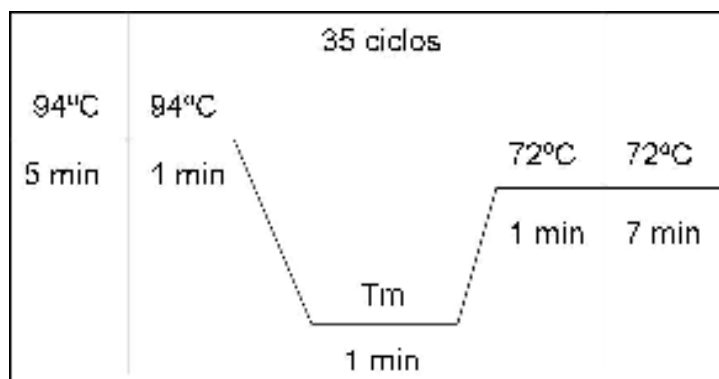


Figura 19. Ciclo gradiente.

5.3.3. Sequenciamento automático

Todos os fragmentos obtidos foram diretamente sequenciados. Na primeira etapa, os produtos de PCR passaram por um processo de purificação com a enzima Exo-Sap (GE™) com o intuito de se remover restos de oligonucleotídeos, DNTPs, e outros reagentes que pudessem afetar a qualidade da reação de sequenciamento.

Em seguida, utilizou-se o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®) para realização da reação de sequenciamento. O protocolo incluiu tampão de sequenciamento 5 X, *big dye termination*, PCR, *primer* (5 pmoles) e H₂O.

O procedimento foi realizado em um aparelho termociclador com programa de ciclagem específico (Figura 20).

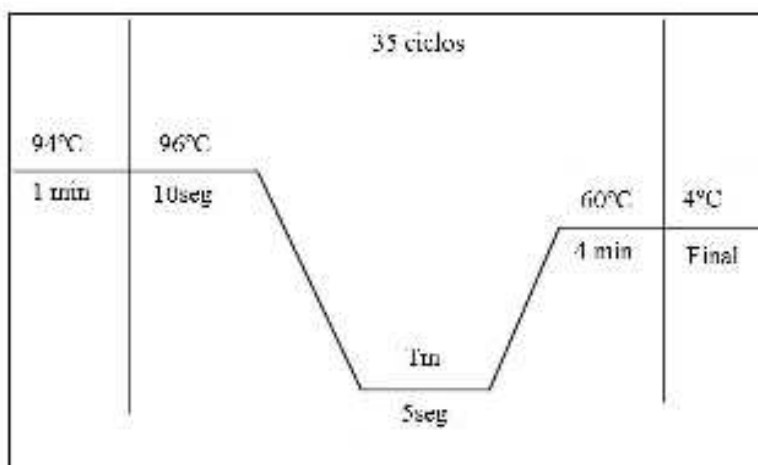


Figura 20. Ciclo utilizado na reação de sequenciamento.

Posteriormente, as reações foram purificadas utilizando-se isopropanol e etanol, também para remover as impurezas que poderiam afetar a qualidade da reação de sequenciamento.

Por fim, os fragmentos foram submetidos a um sistema de eletroforese capilar no equipamento Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyzer® de 24 capilares para determinação da sequência linear.

A análise dos resultados foi feita com o auxílio do programa *Chromas Lite*TM para a visualização da sequência linear dos eletroferogramas e com o auxílio do programa *Gene Runner*[®] para comparar as sequências obtidas com as postadas como referência em base de dados. As alterações encontradas foram pesquisadas no site do *NCBI*, *Ensembl Genome Browser* e *HGMD* (*Human Genome Mutation Database*).

5.3.4. Testes *in silico*

Alterações não sinônimas, que causam substituição de um único aminoácido na sequência protéica, podem ou não alterar a função e a estrutura da proteína. O uso de algoritmos computacionais pode auxiliar na estimativa dessas alterações (251).

Para a análise das alterações não sinônimas encontradas foram utilizados os seguintes testes *in silico*: escala Grantham, Panther, PolyPhen, SIFT e SNP&GO.

A escala Grantham (252) calcula o efeito da substituição de um aminoácido na conservação da estrutura protéica, considerando a composição, a polaridade e o volume molecular de cada aminoácido. Segundo a interpretação dessa escala por Li et al. (253), a substituição de um aminoácido pode ser considerada “conservativa” (valores entre 0-50), “moderadamente conservativa” (valores entre 51-100), “moderadamente radical” (valores entre 101-150) e “radical” (valores acima de 151), de acordo com as diferenças físico-químicas.

O programa Panther (<http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp>) estima o efeito patogênico de uma substituição de aminoácido em uma determinada proteína considerando a função desta proteína na escala evolutiva. Baseado em Cadeia de Markov Oculta, o programa calcula o escore subPSEC (*Substitution Position-Specific Evolutionary Conservation*). Valores de subPSEC menores que -3 permitem considerar a substituição deletéria (254).

O PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) estima o efeito da troca de aminoácidos em uma proteína, considerando o nível de conservação da sequência entre genes homólogos e a proximidade da substituição a domínios funcionais e estruturais da proteína (255).

Os resultados do escore, segundo Xi et al. (256), são classificados em “provavelmente deletério” (≥ 2.00), “possivelmente deletério” (1.50-1.99), “potencialmente deletério” (1.25-1.49), “limítrofe” (1.00-1.24) ou “benigno” (0.00-0.99).

O programa SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) estima se a substituição de um aminoácido afeta a função de uma proteína através do alinhamento de sequências protéicas homólogas, baseando-se na premissa de que aminoácidos importantes estarão conservados entre sequências de uma família protéica (257). Segundo a classificação proposta por Ng e Henikoff (258) e Xi et al. (256), as variantes são classificadas em “não tolerantes” (escore entre 0.00-0.05), “potencialmente não tolerantes” (escore 0.051-0.10), “limítrofes” (escores entre 0.101-0.20) e “tolerantes” (escores entre 0.201-1.00).

A ferramenta SNPs&GO (<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>) estima o efeito na proteína em “neutro” ou “deletério” por um escore baseado em informações do GO (*gene ontology*) e estima uma média de confiabilidade de 0 a 10 (258). O projeto GO caracteriza os genes quanto ao papel destes em processos biológicos, produção de componentes celulares e função molecular da proteína codificada (259).

O nível de concordância entre os resultados da escala Grantham e dos algoritmos PolyPhen e SIFT é de 88,1% (251). Segundo Thusberg et al. (260), dentre os testes Panther, Polyphen, SIFT e SNP&GO, o programa SNPs&GO apresentou maior nível de confiabilidade de seus resultados.

5.4. Análises complementares

No paciente 5 com suspeita clínica da síndrome EEC, a triagem de mutações foi específica para o gene *P63* (protocolo - Anexo III).

Com relação ao paciente 21, para a caracterização do desequilíbrio genômico identificado pelo exame de cariótipo e pela *aGH*, as técnicas complementares *FISH*, *MLPA* e o sequenciamento do gene *PAX6* (protocolo - Anexo III) foram realizadas. Os oligonucleotídeos

para a amplificação do gene *PAX6* foram cedidos pela Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp.

5.4.1. FISH

A técnica de *FISH* foi feita a partir de suspensões celulares obtidas por meio de cultura de linfócitos. O método utilizado foi baseado no protocolo descrito por Pinkel et al. (208), com pequenas modificações, utilizando a sonda comercial *locus* específica MD IGF1R (15q26)/15q11 (Poseidon™).

Foram analisadas 20 metáfases por amostra em um microscópio de fluorescência *BX51-BF-II/BX2* da *Olympus*® com filtros de fluorescência adequados. As imagens foram capturadas utilizando o software *FISHView* da *Applied Spectral Imaging*®.

5.4.2. MLPA

A técnica de *MLPA* foi realizada segundo o protocolo original descrito por Schouten et al. (261), com pequenas modificações, utilizando o Kit P250-A1 DiGeorge (MRC-Holland *MLPA*®).

As análises de qualidade dos resultados foram realizadas com o *software* MegaBACE™ Fragment Profiler. Em seguida a análise dos dados foi feita no programa Excel (Microsoft®), em macros específicos fornecidos *on line* pelo fabricante do kit de *MLPA* (MRC-Holland®).

RESULTADOS

6. Resultados

6.1. Investigação das CNVs

6.1.1. Qualidade dos experimentos de *aGH*

Todos os indivíduos da casuística foram analisados pela técnica de *aGH*. Após o processamento, verificou-se a qualidade dos experimentos. A análise do escaneamento dos *chips* foi feita através do programa GCOS (Affymetrix®). Por esta análise visual, constatou-se problemas de hibridação em 2 *chips*. Os outros *chips* apresentaram um padrão visual dentro do esperado. Após a repetição dos experimentos com as amostras dos pacientes em que os *chips* apresentaram problemas, o resultado foi satisfatório.





Pelo programa *Genotyping Console*® (Affymetrix®) os parâmetros de qualidade foram observados pelos dados do *call rate* e CQC. Os valores de *call rate* de todos os experimentos, ficaram acima de 93%, muito além do mínimo indicado pela fabricante que é de 86% e com relação ao índice CQC, os *chips* apresentaram o valor mínimo ou acima do esperado. Assim, todos os *chips* puderam ser processados para análise de CNVs.

6.1.2. Análise das CNVs

De um modo geral, os resultados entre os dois programas utilizados foram semelhantes. Utilizando o programa *Genotyping Console*® (Affymetrix®), foi encontrado nos portadores de FOT um total de 332 CNVs (>100kb), distribuídos por praticamente todos os cromossomos. Por paciente, a média foi de 14 CNVs sendo as duplicações mais frequentes que as deleções (207 duplicações, 125 deleções) (Tabela 3). Nenhum padrão de recorrência relevante de CNVs foi encontrado entre os indivíduos portadores de FOT.

Tabela 3. Resumo das *CNVs* encontradas na presente amostra de indivíduos com FOT.

ID	Tipo de fenda	Grupo	Total de <i>CNVs</i>	Número de duplicações	Número de deleções
1	FL/P	1	17	5	12
2	FL	1	12	5	7
3	FL/P	1	20	19	1
4	FL	1	8	4	4
5	FL	1	46	43	3
6	FLP	1	18	14	4
7	FL/P	1	8	3	5
8	FLP	1	7	4	3
9	FL	1	12	4	8
10	FL	1	10	9	1
11	FL/P	1	13	8	5
12	FL/P	1	10	8	2
13	FL/P	2	10	2	8
14	FL	2	11	2	9
15	FL	2	13	9	4
16	FL e palatal submucosa	2	18	13	5
17	FL	2	13	7	6
18	FL/P	2	12	9	3
19	FL	2	14	6	8
20	FP	3	14	3	11
21	FP submucosa	3	9	5	4
22	FP submucosa	3	13	8	5
23	FP	4	24	17	7

Legenda:  Representação grupo 1  Representação grupo 2
 Representação grupo 3  Representação grupo 4

Com relação às *CNVs* não descritas em indivíduos normais na base de dados *DGV*, considerando *CNVs* no mesmo sentido (duplicação ou deleção), foram encontradas 16 em um 10 pacientes (Tabela 4). Todos os genes localizados nessas regiões foram pesquisados em bases de dados *Ensembl Genome Browser* e *NCBI*, para análise de sua função, padrão de expressão e associação com condições patogênicas.

Tabela 4. Resumo das *CNVs* não descritas na base de dados *DGV*.

ID	Grupo	Tipo (Del/Dup)	Tamanho	Localização	Origem (mat/pat) ou <i>de novo</i>	Genes afetados	Presentes <i>DECIPHER</i>
2	1	Del	270kb	1p36.11	paterna	<i>TCEB3, LYPLA2, GALE, HMGCL, FUCA, CNR2, PNRC2, SRSF10 (FUSIP)</i>	Sim
3	1	Dup	125kb	10q33.33	materna	<i>CYP2C9</i>	Sim
5	1	Dup	176kb	1q32.3	<i>de novo?</i>	<i>RPS6KC1</i>	Não
5	1	Dup	112kb	3q21.3	materna	<i>ISY1, CNBP</i>	Não
5	1	Dup	119kb	14q23.3	<i>de novo?</i>	<i>FUT8</i>	Não
5	1	Dup	122kb	17q11.2	<i>de novo?</i>	<i>TAOK1</i>	Não
6	1	Dup	114kb	4p15.2	<i>de novo?</i>	<i>PI4K2B</i>	Não
8	1	Del	119kb	2q32.3	materna	Não tem genes	Não
10	1	Del	113kb	10q25.1	materna	Não tem genes	Sim
13	2	Del	120kb	3q22.1	paterna	<i>KRBOX1</i> e <i>FAM198A</i>	Não
13	2	Dup	212kb	18q22.3	materna	<i>FAM69C</i> e <i>CNDP2</i>	Não
16	2	Dup	135kb	8p23.3	<i>de novo</i>	Não tem genes	Não
22	3	Del	154kb	4q32.2	materna	<i>FSTL5</i>	Não
22	3	Dup	120kb	8p22	materna	<i>C8orf79, DLC1</i>	Sim
23	4	Dup	110kb	8q22.1	<i>de novo</i>	C8orf83	Não
23	4	Dup	100kb	19p13.2	materna (mãe com FP não-sindrômica)	<i>CYP4F22, CYP4F8, CYP4F3</i>	Sim

Legenda: *de novo?*: refere-se a pacientes em que a origem da *CNV* não pode ser avaliada em um dos genitores; del: deleção, dup: duplicação.



Representação grupo 1



Representação grupo 2



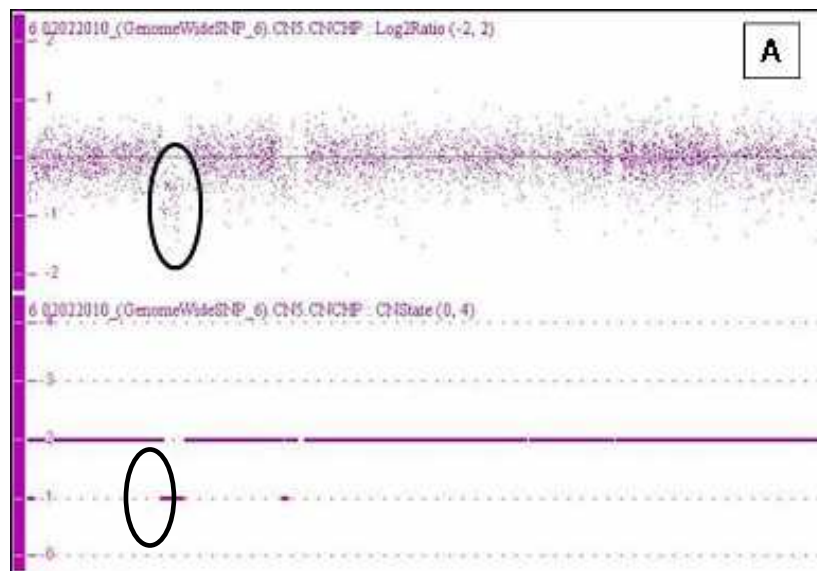
Representação grupo 3



Representação grupo 4

Todas as regiões de *CNVs* foram observadas com relação à presença ou não de sequências codificantes. Aproximadamente 150 *CNVs* envolviam genes descritos na base de dados do *Ensembl Genome Browser*. Em seguida, informações sobre os genes foram pesquisadas na base de dados *NCBI*. Assim, considerando também os outros parâmetros de análise descritos no item 5.2.1.2 dos “métodos”, destacou-se uma *CNV* encontrada em um dos pacientes da amostra.

O paciente 2 (FL síndrômica) apresentou uma deleção de 270kb (Figura 21a) envolvendo 76 marcadores na região 1p36.11 (23903625- 24173440 [hg18]). O resultado foi concordante entre os dois *softwares* utilizados. Esta região de *CNV* engloba oito genes, com destaque para o gene *TCEB3* (Figura 21b). O caso 4661 do *DECIPHER* apresenta uma deleção *de novo* de 1.88Mb, envolvendo este mesmo gene, em um paciente com FP síndrômica. A região específica deste gene não está documentada em controles na base de dados *DGV*. Entretanto o pai do paciente 2, que não apresenta fenda visível, possui a mesma alteração.



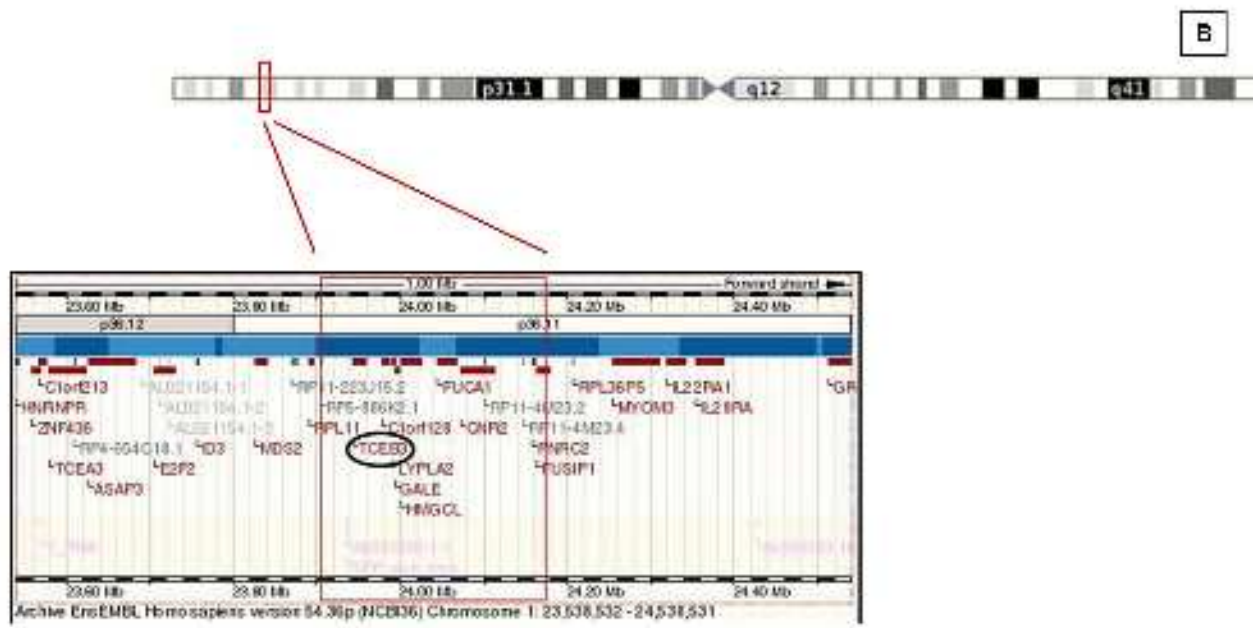


Figura 21. Deleção 1p36.11 no paciente 2. **A)** Perfil de hibridação do cromossomo 1 evidenciando (círculo preto) a redução no número de cópias de um seguimento de 270kb (localização genômica 23903625- 24173440 [hg18]). Quadrante superior mostra o gráfico com os valores do $\log_2\text{ratio}$ (-1) e o gráfico abaixo mostra os valores do CNstate (1). **B)** Ideograma do cromossomo 1 indicando a região deletada (retângulo vermelho) com a apresentação dos genes contidos nesta região com destaque para o gene *TCEB3* (fonte: *Ensembl Genome Browser*).

6.1.3. Análise de CNVs nas regiões dos genes candidatos

Nas regiões dos genes de interesse avaliados neste trabalho, alterações menores que 100kb foram analisadas pelo *software Genotyping Console 4.0* (Affymetrix®), com exceção dos genes *FOXE1* e *FGF8* por não apresentaram marcadores representativos de suas sequências no *chip* utilizado.

O paciente 6 (FLP síndrômica) apresentou um segmento de 96kb duplicado (38431900-38441500 [hg18]) envolvendo parte do gene *FGFR1* (intron 16 e exon 17) (Figura 22). O resultado foi concordante entre os dois *softwares* utilizados. A região específica deste gene não está documentada em controles na base de dados *DGV* e tal alteração não foi herdada da mãe do paciente. Não foi possível avaliar o pai deste paciente.

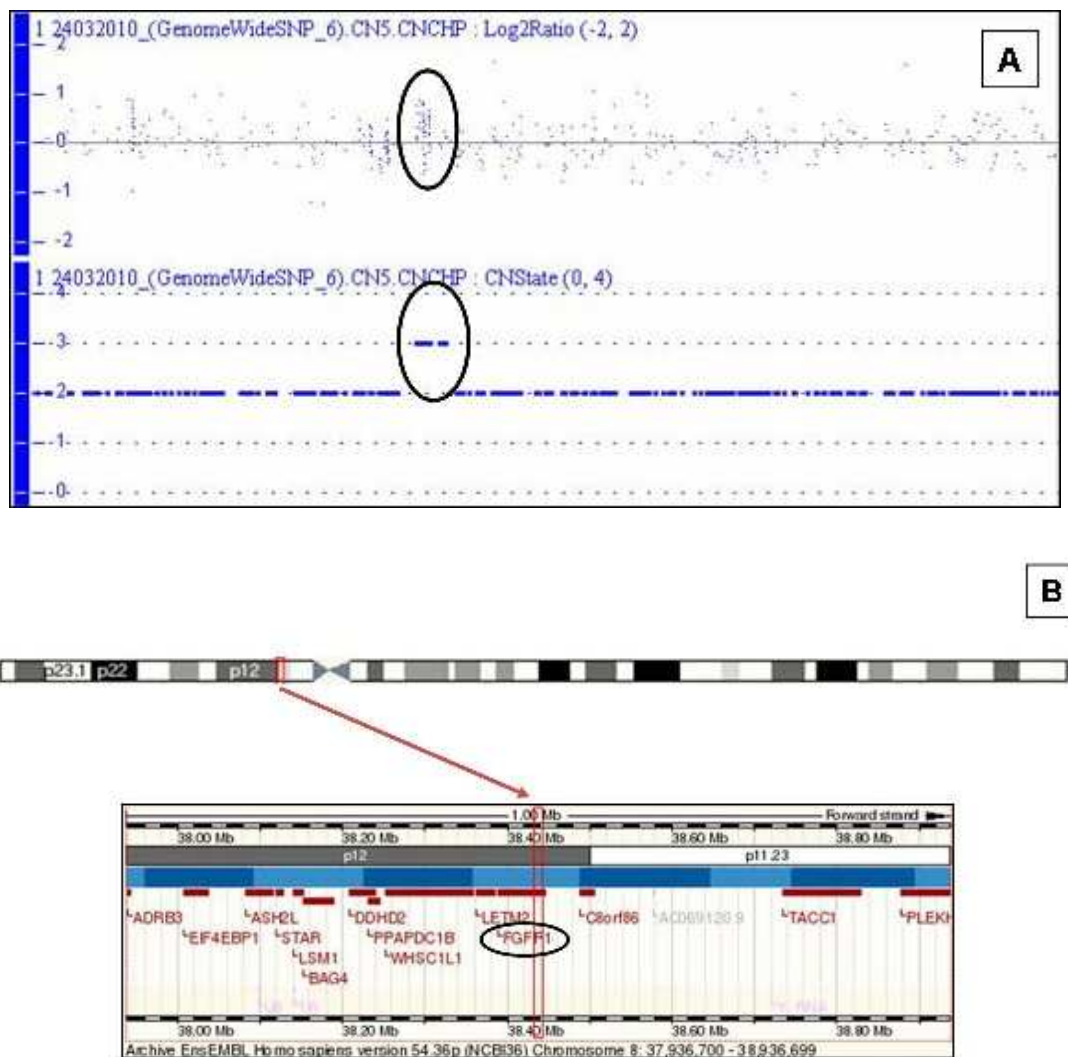


Figura 22. Duplicação 8p11.2 no paciente 6. **A)** Perfil de hibridação do cromossomo 8 evidenciando (círculo preto) o aumento no número de cópias de um segmento de 96kb (localização genômica 38431900-38441500 [hg18]). Quadrante superior mostra o gráfico com os valores do \log_2ratio (1) e o gráfico abaixo mostra os valores do $CNstate$ (3). **B)** Ideograma do cromossomo 8 indicando a região duplicada (retângulo vermelho) com destaque para o *FGFR1* contido nesta região (fonte: *Ensembl Genome Browser*).

O paciente 5 possui um quadro clínico de anomalias de membros incluindo mãos fendidas e FP, semelhante ao descrito em pacientes com mutações no gene *P63* (72, 73, 74, 201, 203, 204, 262, 263). Assim, a região 3q28, onde localiza-se este gene, foi avaliada para a alterações <

100kb. Considerando a presença de alterações ósseas, como hipoplasia de artelhos e agenesia bilateral de tibia, as regiões 1q42.2-q43, 2q14.2, 2q31, 7q21.2–21.3, Xq26.3, 10q24–q25, 17p13.1–17p13.3 apontadas em artigos recentes como envolvidas na gênese destas características (264, 265, 266) também foram analisadas. Não sendo detectadas *CNVs* nessas regiões, optou-se por complementar a investigação com o sequenciamento do gene *P63*, já padronizado no laboratório.

6.2. Estudo dos casos com aberrações cromossômicas

A paciente 9, foi diagnosticada com uma translocação t(4;5)(p10;p10) pela técnica de cariótipo (Figura 23) herdada de seu pai. O perfil de hibridação dos cromossomos 4 e 5 pela técnica de aGH não apresentou alterações no número de cópias do DNA (Figura 24), confirmando que esta translocação é realmente equilibrada.

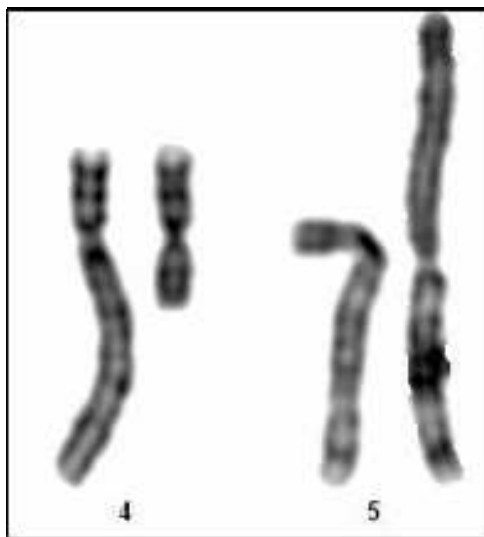


Figura 23. Cariótipo parcial (400-550 bandas) dos cromossomos envolvidos na translocação da paciente 9.

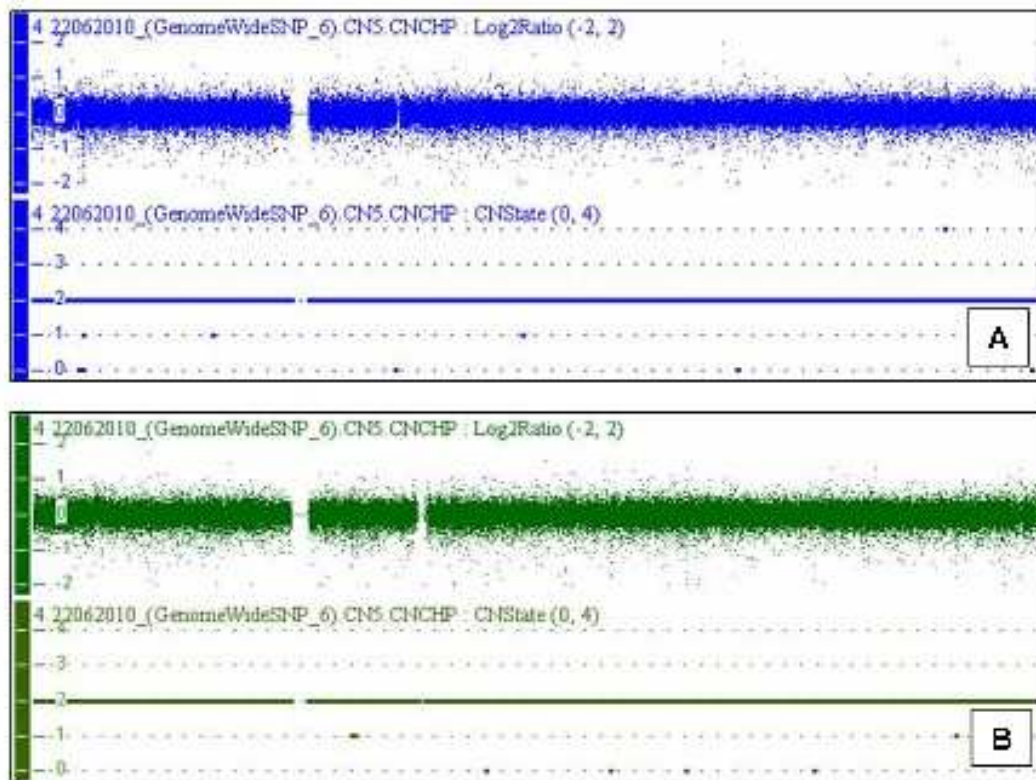


Figura 24. Perfil de hibridação dos cromossomos 4 e 5 do paciente 9. **A)** Perfil de hibridação do cromossomo 4 e **B)** Perfil de hibridação do cromossomo 5 sem *CNVs*.

Com relação ao paciente 21, do sexo masculino, já falecido, este apresentou no exame dismorfológico fenda palatal submucosa, face alongada, hipertelorismo ocular, epicanto, hipoplasia alar, nariz com ponta bífida e orelhas dismórficas. Dentre as alterações oftalmológicas destacaram-se aniridia congênita bilateral, estrabismo e nistagmo. Além disso, o paciente também apresentava alterações do trato urinário (hidronefrose), anomalia cardíaca (defeito de septo interventricular) e retardo do desenvolvimento.

A análise do cariótipo havia revelado uma inserção intersticial no cromossomo 11, entretanto pelo padrão de bandas não foi possível determinar a origem do fragmento inserido, sendo o cariótipo 46,XY,ins(11;?)(p13;?)[20] e também, levantou a suspeita de um material adicional no cromossomo 8 (Figura 25). A técnica de *aGH* revelou uma duplicação de 17Mb na

região 15q25-26 (81869248-98962477 bp [hg18]) (Figura 26) e também uma duplicação de 3,8 Mb de sequência da região 8p23.1 (8129435-11934586 bp [hg18]) (Figura 27). Utilizando a técnica de *FISH* com a sonda MD IGF1R (15q16)/15q11 (Poseidon™), a inserção do fragmento duplicado do cromossomo 15 no cromossomo 11 foi confirmada (Figura 28), conduzindo o resultado do cariótipo do paciente em 46,XY, der(11)ins(11;15)(p13;q25q26). A duplicação de 3,8Mb na região 8p23.1 foi confirmada pela técnica de *MLPA* utilizando o kit SALSA P250 (Figura 29).

A presença de aniridia neste paciente indicou a análise mais detalhada dos dados de *aGH* para a região 11p13, onde localiza-se o gene *PAX6* cuja mutações estão associadas a esta anomalia. A triagem de mutações no mesmo não revelou alterações de sequência. Como observada na figura 30, detectou-se uma deleção de aproximadamente 49 kb (31706160-31755245 [hg18]), envolvendo o gene *ELP4*, próxima ao gene *PAX6*. Esta deleção foi confirmada utilizando outra plataforma do tipo *array-CGH* 4X180K (Agilent®) (Figura 31). Este último experimento foi realizado em parceria com o laboratório da Dra. Carla Rosenberg do Depto. de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da USP. A análise do cariótipo e *array* dos pais deste paciente revelaram-se normais.

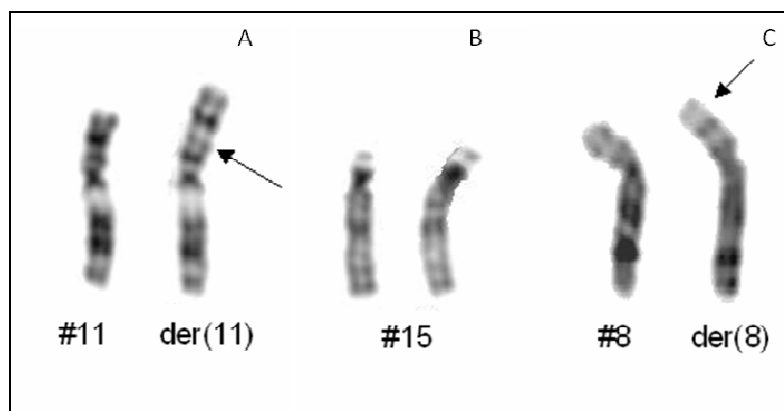


Figura 25. Cariótipo parcial (400-550 bandas) dos cromossomos envolvidos (paciente 21). **A)** translocação intersticial do cromossomo 11p13. **B)** ambos os cromossomos 15 com padrão de bandas normais. **C)** cromossomo 8 com segmento adicional no braço curto.

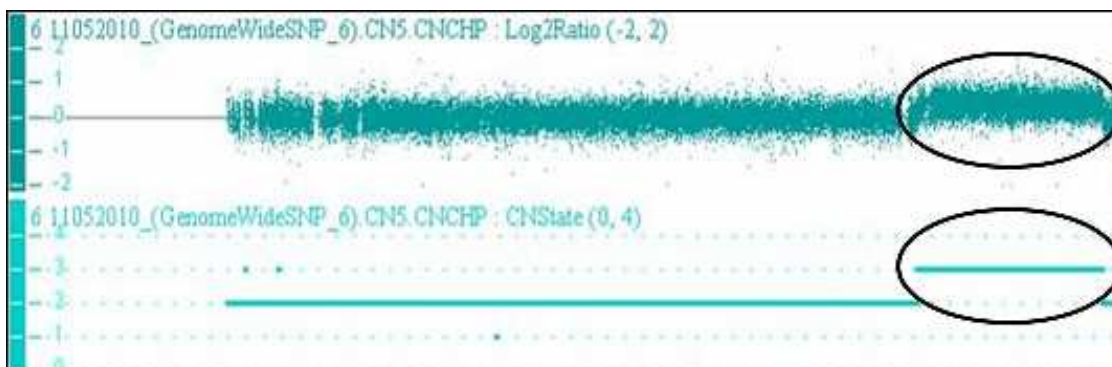


Figura 26. Duplicação 15q25-26 no paciente 21. Perfil de hibridação do cromossomo 15 evidenciando (circulo preto) o aumento no número de cópias de um seguimento de 17Mb (localização genômica 81869248-98962477 [hg18]). Quadrante superior mostra o gráfico com os valores do *log2ratio* (1) e o gráfico abaixo mostra os valores do *CNstate* (3).

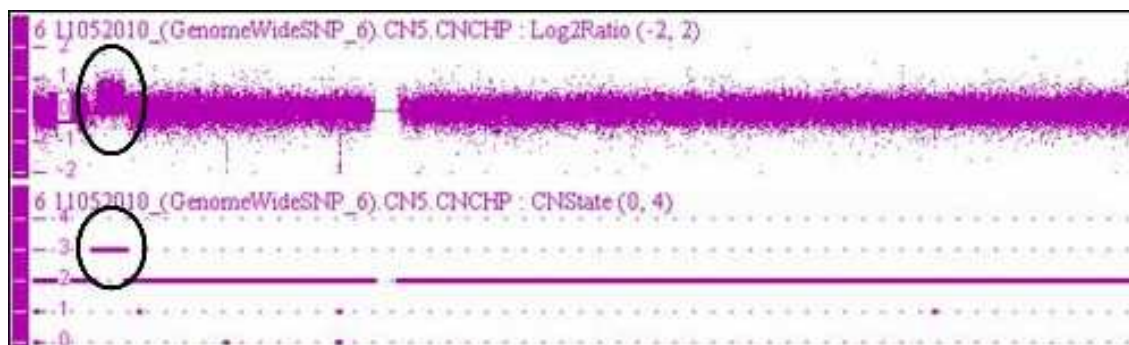


Figura 27. Duplicação 8p23 no paciente 21. Perfil de hibridação do cromossomo 8 com destaque (circulo preto) para o aumento no número de cópias de um segmento de 3.8 Mb (localização genômica 8129435-11934586 [hg18]). Quadrante superior mostra o gráfico com os valores do *log2ratio* (1) e o gráfico abaixo mostra os valores do *CNstate* (3).

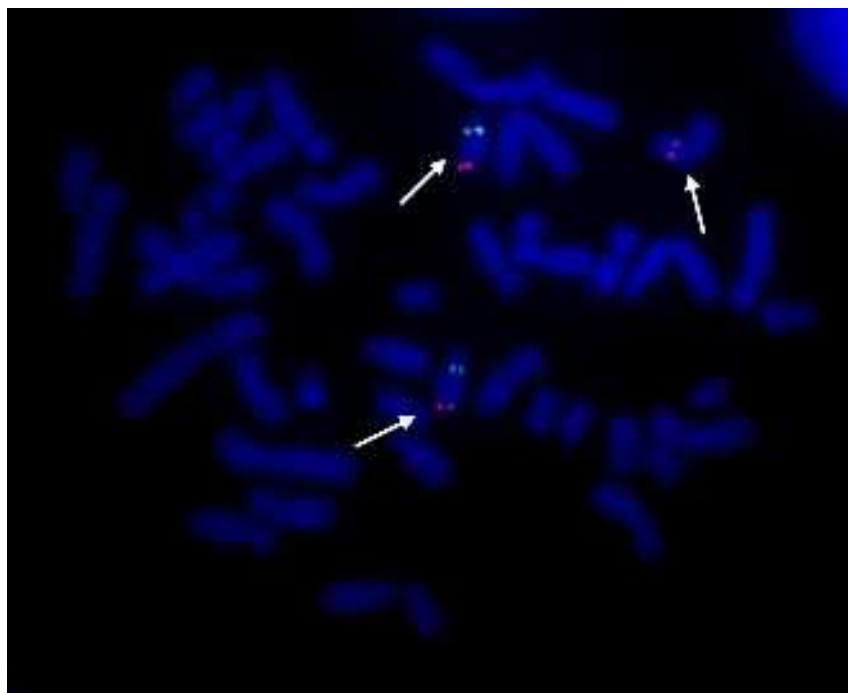


Figura 28. Fotografia de uma metáfase do paciente 21. Destaque (setas brancas) para as marcações da sonda MD IGF1R (15q26)/15q11. Os sinais verdes referem-se à região controle da sonda utilizada em 15q11 indicando a presença de dois cromossomos 15 normais. Os sinais vermelhos da sonda referentes à região 15q26 marcaram os dois cromossomos 15 e também hibridaram em outro cromossomo. Assim, devido a análise anterior do cariótipo, conclui-se que esta marcação tratava-se do fragmento duplicado do cromossomo 15 inserido no cromossomo 11 .

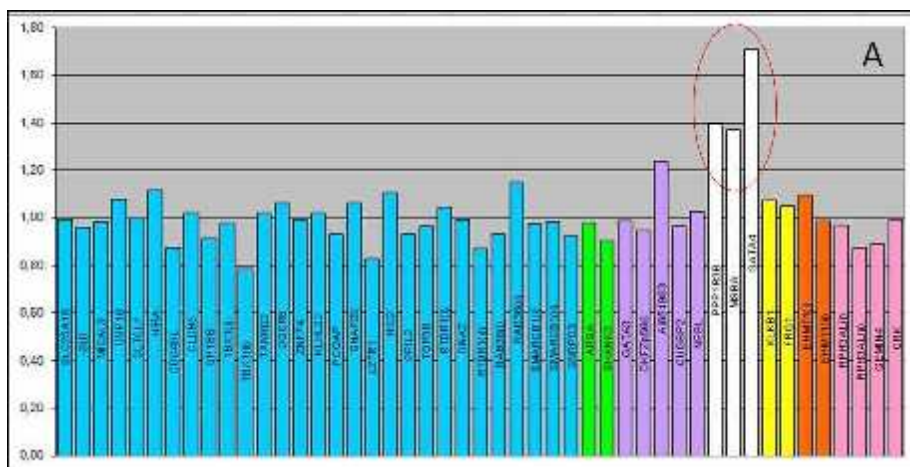


Figura 29. Confirmação da duplicação 8p23 no paciente 21 pela técnica de *MLPA*. Padrão de resultado de duplicação das sondas *PPP1R3B*, *MSRA* e *GATA4* (círculo vermelho) que representam a região 8p23.1 para o Kit P250-A1 – MRC-Holland®

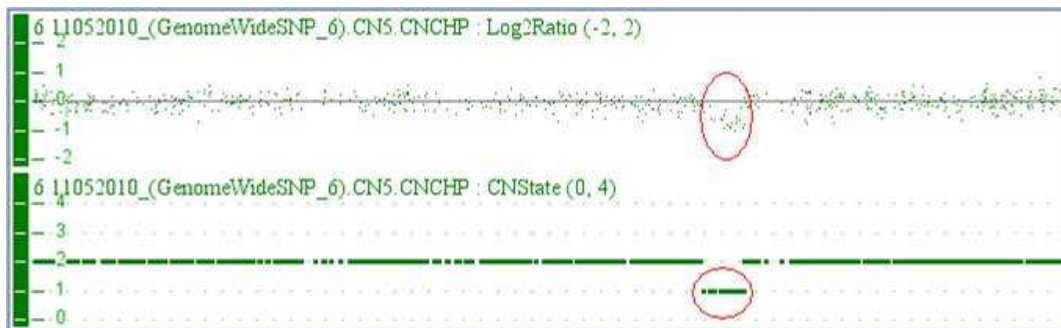


Figura 30. Deleção 11p13 no paciente 21. Perfil de hibridação do cromossomo 11 com destaque (circulo vermelho) para a diminuição no número de cópias de um segmento de 49kb (localização genômica 31706160-31755245 [hg18]). Quadrante superior mostra o gráfico com os valores do *log2ratio* (-1) e o gráfico abaixo mostra os valores do *CNstate* (1).

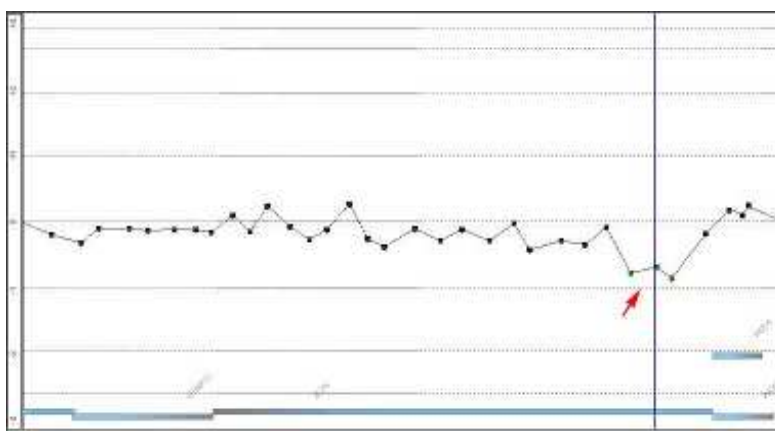


Figura 31. Confirmação da deleção 11p13 no paciente 21 pela plataforma Agilent®. Perfil de hibridação do cromossomo 11 com destaque (seta vermelho) para a diminuição no número de cópias de um segmento de 49kb.

6.3. Análise dos sequenciamentos dos genes candidatos

A triagem dos genes candidatos não detectou alterações com potencial patogênico nos seguintes genes: *IRF6*, *MSX2*, *SKI*, *SATB2*, *SPRY1*, e *FGFR1*. Entretanto, nestes e em outros genes, a leitura dos sequenciamentos revelou alterações descritas como *SNPs* em bases dados *dbSNP* do NCBI e *Ensembl Genome Browser*. A tabela 5 resume os polimorfismos encontrados.

Tabela 5. Polimorfismos encontrados nos genes analisados.

ID	Gene	Posição	SNP	Troca	Aminoácido
1, 20	<i>IRF6</i>	Intron-Exon 3	GA019909	T>G	UTR
1, 3, 4, 7, 17	<i>IRF6</i>	Exon 5	rs2013162	G>T	Ser153Ser
1, 20	<i>IRF6</i>	Exon 8	rs61099902	T>C	Leu385Leu
3	<i>IRF6</i>	Exon 7	rs2235371	G>A	Val274Ile
13	<i>FOXE1</i>	Exon 1	rs3021523	T>C	Leu129Leu
1, 2,17, 20	<i>FOXE1</i>	Exon 1	rs3021524	C>A	Ala168Ala
1, 3, 20, 14,16, 17, 23	<i>FOXE1</i>	Exon 1	rs3021526	C>T	Ser275Ser
9, 13, 14, 19	<i>GLI2</i>	Exon 14	rs3738880	G>T	Ser1156Ala,
7, 13	<i>GLI2</i>	Exon 14	rs12711538	G>A	Asp1306Asn
1, 9, 16, 19, 20	<i>GLI2</i>	Exon 14	rs2278741	G>C	UTR3'
1, 2, 3, 13,14, 16, 19	<i>MSX2</i>	Exon 2	rs4242182	T>C	Met129Thr
13, 14	<i>SKI</i>	Intron-Exon 4	GA000110	T>G	UTR
14	<i>SKI</i>	Intron-Exon 5	GA000112	T>G	UTR
2, 10, 13	<i>SATB2</i>	Exon 9	rs52837326	A>G	Ser263Pro
15, 19	<i>SPRY1</i>	Exon 3	rs6815848	G>A	Val85Val

Legenda: pacientes 1 a 12 pertencem ao grupo 1; pacientes 13 a 19 pertencem ao grupo 2; pacientes 20 a 22 pertencem ao grupo 3; paciente 23 pertence ao grupo 4.

Alterações de sequência não descritas em bases de dados foram encontradas nos genes *FOXE1*, *GLI2*, *MSX1* e *FGF8*. Na tabela 6 encontra-se o resumo das variantes encontradas e os resultados dos testes *in silico* para alterações não-sinônimas. Os testes *in silico* não foram realizados na alteração encontrada no gene *FOXE1*, paciente 9, pois esta é sinônima.

Tabela 6. Alterações não descritas em base de dados encontrados nos genes analisados.

ID	Grupo	Gene	Variante	Escala Gratham	Panther	Polyphen	SFIT	SNPs&GO
2	1	<i>MSXI</i>	Ala32Val	Moderadamente conservativa (escore 64)	Não deletéria (<i>p-deleterius</i> = 0,31541)	Benigna	Não-tolerante (escore 0,00)	Neutra (confiabilidade média = 1)
11	1	<i>FGF8</i>	Glu236Lis	Moderadamente conservativa (escore 56)	Não deletéria (<i>p-deleterius</i> = 0,09195)	Benigna	Não-tolerante (escore 0,00)	Neutra (confiabilidade média = 9)
17	2	<i>GLI2</i>	Leu761Phe	Conservativa (escore 22)	Não deletéria (<i>p-deleterius</i> = 0,37233)	Benigna	Não-tolerante (escore 0,00)	Deletéria (confiabilidade média = 10)

Legenda: Representação do grupo 1 Representação do grupo 2

➤ **Gene *MSXI***

A troca 329C →T (Ala32Val) ocorreu em heterozigose no exon 1 (Figura 32) do paciente 2 e é de herança materna.

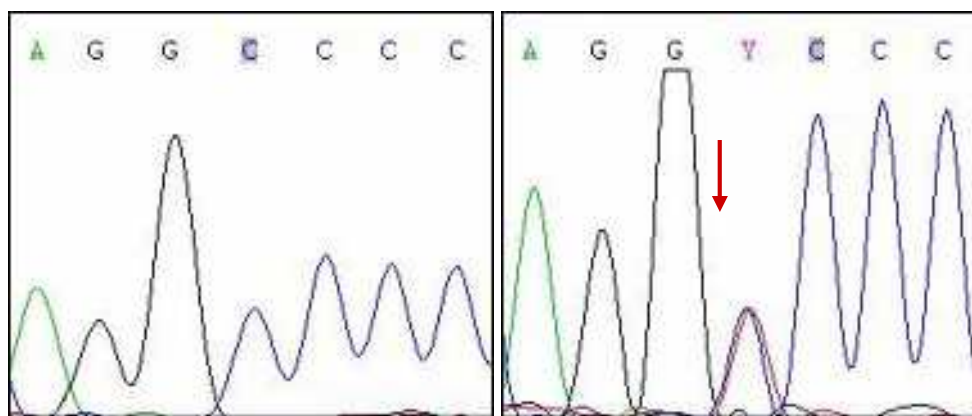


Figura 32. Cromatogramas do gene *MSXI*. Sequência selvagem (à esquerda) e alterada (à direita) mostrando a alteração na posição 95 CDNA (GCC> GTC) (sequência referência ENST00000382723 [hg18]).

➤ **Gene *FOXE1***

A troca em heterozigose 748C →T (Ala28Ala), no exon 1 (Figura 33) do paciente 9 não é herdada por parte da mãe. Não foi possível a investigação do genitor masculino.

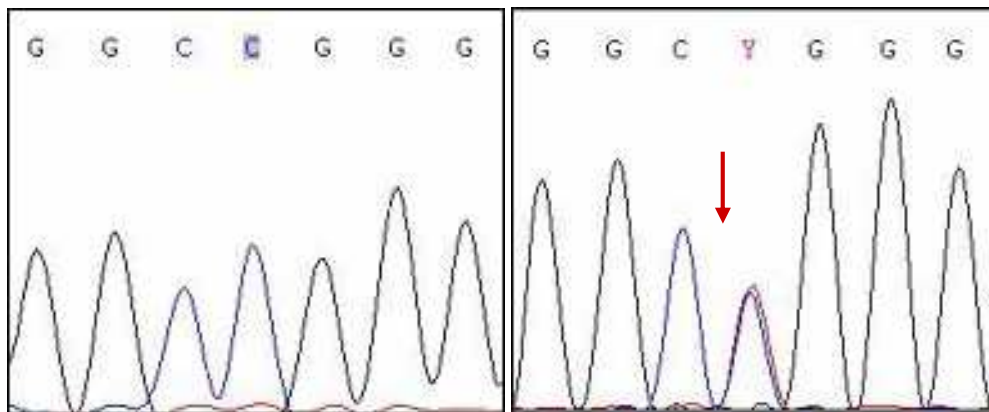


Figura 33. Cromatogramas do gene *FOXE1*. Sequência selvagem (à esquerda) e alterada (à direita) mostrando a alteração na posição 87 CDNA (GCC>GCT) (sequência referência ENST00000375123 [hg18]).

➤ **Gene *FGF8***

Troca 765C →A (Glu236Lis), em heterozigose no exon 6 (Figura 34) do paciente 11 não é herdada por parte da mãe (pai não avaliado).

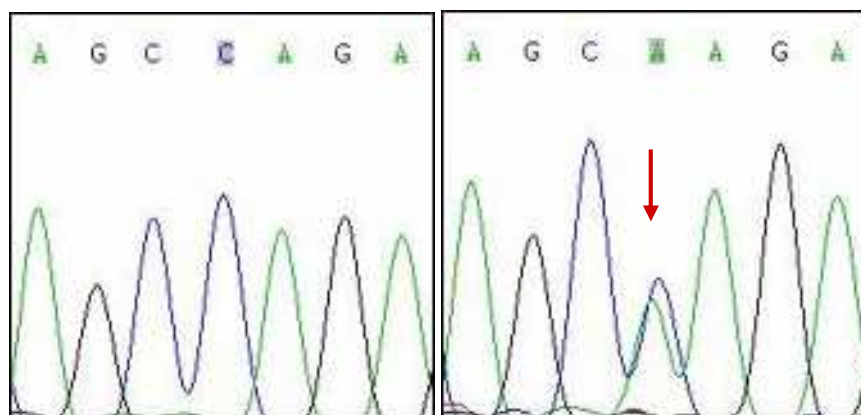


Figura 34. Cromatogramas do gene *FGF8*. Sequência selvagem (à esquerda) e alterada (à direita) mostrando a alteração na posição 707 (CAG>AAG) (sequência referência ENST00000320185 [hg18]).

➤ **Gene *GLI2***

Troca em heterozigose 2341C →T (Leu761Phe), exon 13 (Figura 35). Esta alteração no paciente 17 é de herança materna.

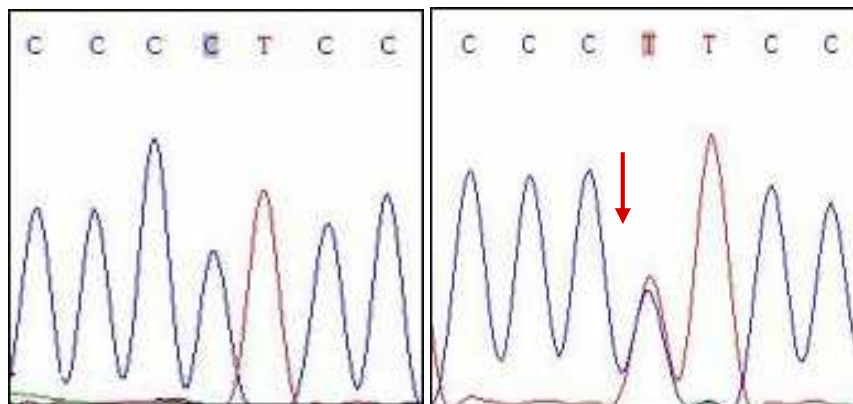


Figura 35. Cromatogramas do gene *GLI2*. Sequência selvagem (à esquerda) e alterada (à direita) mostrando a alteração na posição 2281 (CTC>TTC) (sequência referência ENST00000341310 [hg18]).

Com relação ao paciente 5, que apresentava suspeita clínica da síndrome de EEC, o gene *P63* foi sequenciado, no qual foi encontrada uma inserção de 4 nucleotídeos AGAG antes de seu códon iniciador, na porção não traduzida do exon 1 (posição 71 da sequência gênica, ENST00000264731 [hg18]). Isto resultou em uma mutação do tipo *frameshift* (Figuras 36 e 37).

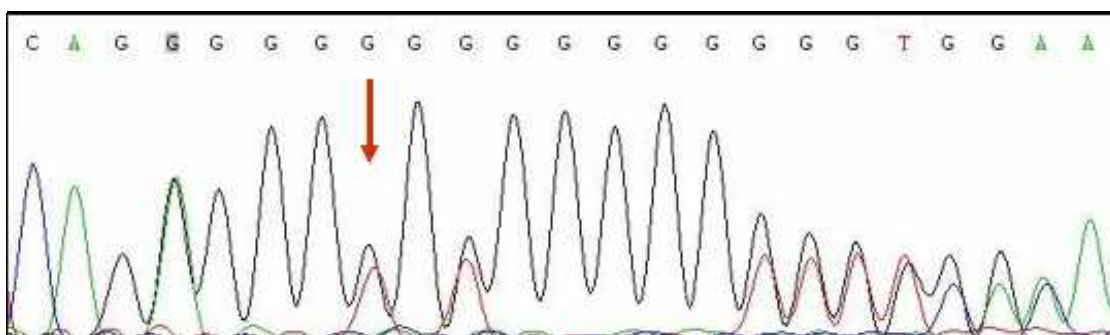


Figura 36. Cromatograma evidenciando (seta vermelha) a inserção de bases e a mutação *frameshift* no gene *P63*.

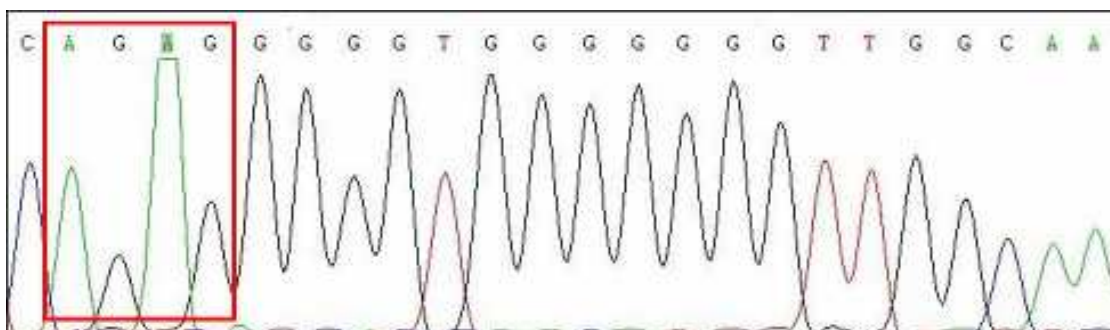






Figura 37. Cromatograma do fragmento clonado evidenciando a inserção das quatro bases AGAG (quadrado vermelho) no gene *P63*.

Todos os resultados encontrados estão resumidos na tabela abaixo.

Tabela 7. Síntese de todos os resultados encontrados.

ID	Tipo de fenda	Grupo	Cariótipo	<i>aGH</i>	Triagem de mutações	Estudos futuros
1	FLP	1	46,XX	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i>	Não
2	FL	1	46,XY	Deleção 1p36.11 (gene <i>TCEB3</i>)	<i>SNPs</i> e mutação gene <i>MSX1</i>	Sim
3	FLP	1	46,XY	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i>	Não
4	FL	1	46,XX	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i>	Não
5	FL	1	46,XY	Nenhum dado relevante	Mutação gene <i>P63</i>	Sim
6	FLP	1	46, XY	Duplicação 8p11.2 (gene <i>FGFR1</i>)	Sem alterações	Sim
7	FLP	1	46,XX	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i>	Não
8	FLP	1	46, XX	Nenhum dado relevante	Sem alterações	Não
9	FL	1	46,XX, t(4;5)(p10;p10)pat,9qh+pat,16qh+mat[50]	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i> e alteração sinônima gene <i>FOXE1</i>	Não
10	FL	1	46, XX	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i>	Não
11	FLP	1	46, XX	Nenhum dado relevante	Mutação gene <i>FGF8</i>	Sim
12	FLP	1	46,XY	Nenhum dado relevante	Sem alterações	Não
13	FLP	2	46, XY	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i>	Não

14	FL	2	46,XY	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i>	Não
15	FL	2	46,XY	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i>	Não
16	FL e palatal submucosa	2	46,XY	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i>	Não
17	FL	2	46, XY	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i> e mutação gene <i>GLI2</i>	Sim
18	FLP	2	46,XY	Nenhum dado relevante	Sem alterações	Não
19	FL	2	46, XX	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i>	Não
20	FP	3	46,XY	Nenhum dado relevante	<i>SNPs</i>	Não
21	FP submucosa	3	46, XY, ins (11;?) (p13;?) [20]	Duplicação 15q25-26; deleção 11p13; duplicação 8p23.1	Sem alterações	Sim
22	FP submucosa	3	46,XX	Nenhum dado relevante	Sem alterações	Não
23	FP	4	46,XX	Nenhum dado relevante	Sem alterações	Não

Legenda:  Representação grupo 1  Representação grupo 2
 Representação grupo 3  Representação grupo 4

DISCUSSÃO

7. Discussão

Os estudos dos fatores genéticos em FOT têm utilizado diferentes abordagens. Entre elas, destacam-se os estudos populacionais com genes candidatos onde é possível a realização de análises estatísticas. No presente trabalho, optou-se por utilizar uma abordagem individualizada, em que diferentes estratégias laboratoriais complementaram a avaliação clínica. Para tanto, caracterizou-se a amostra a partir de bases embriológicas e classificação clínica do tipo de fenda e formou-se grupo controle bem definido. A discussão foi dividida em tópicos para melhor organização.

7.1. Caracterização da amostra

Considerando a divisão em FL/P e FP, conforme os aspectos embriológicos conhecidos (1, 2) houve predominância de casos de FL/P (19 casos dos 23). Mesmo a casuística sendo pequena, a prevalência de FL/P está em concordância com outros estudos brasileiros (27, 267).

Com relação à apresentação clínica, os casos síndrômicos (16 no total) foram mais frequentes que os não-síndrômicos (sete no total). No sentido correto, os termos síndrômico e não-síndrômico se referem aos mecanismos genéticos envolvidos em anomalias (268). Entretanto, para as FOTs observa-se a aceitação na literatura destes termos para se referir aos casos de fenda com outras anomalias e aos casos de fenda com nenhuma outra anomalia presente, respectivamente. Desse modo, estes termos foram usados no presente estudo. Porém, vale salientar que recentemente sugeriram-se as designações associada/isolada ao se referir à presença ou ausência de outras anomalias em casos de fenda, e os termos síndrômica/não-síndrômica ao se referir à etiologia (268).

Durante a concepção deste estudo, notou-se a necessidade da análise tanto dos portadores de FOT como de seus respectivos genitores e, em casos familiares, de outros membros da família.

Tal maneira de se compor a amostra mostrou-se realmente justificada ao longo do estudo para a avaliação do padrão de herança das *CNVs* e das alterações de sequência encontradas nos genes investigados. Essa análise não foi possível nos casos dos paciente 6 e 9 para os quais foi realizada apenas a coleta de material da mãe. Nos casos familiares, o estudo de outros membros da família portadores de fenda e dos respectivos genitores evidenciou a ausência de um padrão de *CNVs* relevante entre os indivíduos afetados

7.2. Investigação genética das FOTs

A embriogênese humana requer um rigoroso controle da expressão gênica. A ação coordenada de múltiplos genes e a ativação de uma cascata de sinalização intracelular devem ocorrer de maneira precisa para o desenvolvimento correto das linhagens celulares. Por causa dessa complexidade, a base molecular que controla a embriogênese tem sido objeto de muito interesse em biologia e genética do desenvolvimento.

Do mesmo modo, a formação dos lábios e palato envolve processos embriológicos regulados por vários genes. As estimativas apontam para a hipótese do envolvimento de um *locus* de maior efeito ou de 3 a 14 *loci* interagindo para causar FOTs (40). Muito progresso tem sido feito nos últimos anos para se delinear os mecanismos genéticos envolvidos nas fendas. Entretanto, muitos casos ainda permanecem sem etiologia esclarecida, evidenciando a necessidade de estudos contínuos com a finalidade de colaborar para o conhecimento e caracterização de genes (1, 2, 12, 39).

Devido à abrangência genômica da técnica de *aGH*, a aplicação desta no presente estudo teve o objetivo de avaliar *CNVs* em pacientes com FOT buscando genes de interesse para futuros estudos. Considerando também o papel na gênese das fendas dos genes *IRF6*, *FOXE1*, *GLI2*, *MSX2*, *SKI*, *SATB2*, *SPRY1*, *MSX1*, *FGF8* e *FGFR1* (39, 58), seria oportuno realizar uma triagem de mutações nesses genes em indivíduos com FOT. Esta estratégia mostrou-se acertada, visto que ambos os tipos de investigação apontaram alterações de interessantes.

Os resultados da triagem de *CNVs* não apontaram diferenças significativas entre os casos síndrômicos e não-síndrômicos. Esse fato deve-se principalmente ao fato de a amostra ser pequena, o que não nos permite sugerir uma análise diferencial entre os grupos síndrômicos e não-síndrômicos. As alterações de sequência encontradas nos genes candidatos ocorreram de maneira aleatória e cada uma se apresentou em apenas um paciente. Entretanto, considerando as informações sobre a prevalência de mutações nesses genes em algumas síndromes com FOT, sugere-se que a avaliação clínica detalhada em casos síndrômicos direcione a investigação laboratorial de genes específicos, caso haja dados para embasamento na literatura.

O paciente 2, apresentando uma *CNV* envolvendo o gene *TCEB3* com potencial papel na gênese de fendas e uma alteração de sequência em um dos genes candidatos, exemplifica a importância de ambas as investigações no esclarecimento dos mecanismos etiológicos. Este paciente pertence ao grupo 1 e apresenta um quadro de FL síndrômica, em que se destaca a ocorrência de hirsutismo em fronte, orelhas de implantação baixa e dismórficas, escoliose, braquidactilia de membros superiores, criptorquidia, cardiopatia congênita.

A *CNV*, caracterizada por uma deleção na região 1p36.11, envolveu oito genes: *TCEB3* (NCBI gene ID: 6924, fator de enlogação), *LYPLA2* (NCBI gene ID: 11313, codifica enzima lipídica), *GALE* (NCBI gene ID: 2582, proteína codifica envolvida no metabolismo da galactose), *HMGCL* (NCBI gene ID: 3155, codifica enzima mitocondrial), *FUCAI* (NCBI gene ID: 2517, codifica enzima lisossômica), *CNR2* (NCBI gene ID: 1269, receptor de agentes tóxicos atuantes no metabolismo neuronal), *PNRC2* (NCBI gene ID: 55629, receptor de prolina), *FUSIP* ou *SRSF10* (NCBI gene ID: 10772, fator de transcrição de arginina).

Dentre estes, destacou-se o gene *TCEB3* (*transcription elongation factor B3*) que codifica uma proteína de alongação tipo A, que consiste em uma subunidade do complexo de fator de transcrição B dependente de RNA polimerase II. Essa proteína forma um complexo estável com as proteínas de alongação do tipo B e C (subunidades de regulação) necessário para a correta atividade de alongação durante a transcrição (269). Estudos protéicos evidenciam a interação entre

as proteínas de elongação B e C com domínios de ligação do tipo SPRY (270). Além disso, tal gene também se mostrou deletado em um caso com fenda sindrômica no *DECIPHER* (caso 4661) e sua região específica não está documentada em controles na base de dados *DGV*. Assim, esse gene destacou-se como futuro candidato a ser investigado quanto ao envolvimento do mesmo na etiologia das FOTs.

Esta *CNV* apresentou-se herdada de um genitor (pai) não afetado por FOT, fato que, em teoria, não justificaria a ocorrência de FOT no paciente, já que a presença em um indivíduo normal aponta para variantes constitutivas sem consequências clínicas (247). Contudo, mecanismos como recessividade, *imprinting* ou penetrância incompleta poderiam explicar a presença do fenótipo apenas no paciente e ausência nos genitores (271).

O paciente 2 também apresentou uma alteração de sequência no gene *MSX1*, Ala32Val de herança materna, não descrita em base de dados. Deste modo, pode-se levantar a hipótese de que ambas as alterações, no gene *TCEB3* e no *MSX1*, afetaram os processos celulares durante o desenvolvimento facial do paciente, o que seria condizente com idéia da interação de genes para o desenvolvimento das FOT (40). Entretanto, é necessária a confirmação desta *CNV* por uma técnica independente e análise populacional da alteração em *MSX1*, além de estudos funcionais com as proteínas codificadas por estes genes.

7.2.1. Estudo das *CNVs*

A descoberta das chamadas variações no número de cópias (*CNVs*) é relativamente recente e ocorreu principalmente em estudos com indivíduos fenotipicamente normais (226, 227). O termo *CNV* é comumente encontrado na literatura para designar alterações detectadas na população geral, como as presentes na base de dados *DGV*, mas também para se referir às *CNVs* associadas a condições patogênicas, como as descritas na base de dados *DECIPHER*. No entanto, a classificação de uma *CNV* em patogênica ou não, pode se mostrar complicada e vários pontos devem ser considerados, por exemplo: ocorrência ou não em indivíduos normais, ser herdada ou

não de genitores normais ou afetados, estar descrita em bases de dados associadas a quadros anômalos e presença de genes (245, 246, 247, 248, 249).

As 332 *CNVs* detectadas nos indivíduos portadores de FOTs abrangeram regiões gênicas e regiões inter-gênicas, *CNVs* frequentes na população geral, *CNVs* associadas a fenótipos específicos, assim como *CNVs* raras ou ainda não descritas. Entretanto, considerando os pontos de análise para se determinar a patogenicidade, nenhuma *CNV* atendeu a todos os parâmetros e nenhum padrão de recorrência entre indivíduos afetados foi encontrado. Isso pode ter ocorrido principalmente pelo fato da amostra de indivíduos afetados e o número de indivíduos controle para base comparativa serem pequenos. Com relação aos grupos de pacientes, nenhum padrão diferencial pode ser observado tanto entre os casos síndrômicos e não-síndrômicos como entre os portadores de FL/P e FP.

Dentre as *CNVs* não descritas na base de dados *DGV*, os genes foram investigados quanto a função e os casos descritos na base de dados *DECIPHER* foram observados quanto ao fenótipo associado. Com exceção do caso 2, nenhuma *CNV* se destacou pelos genes envolvidos ou por estarem descritas no *DECIPHER* em casos de FOT. As *CNVs* encontradas nos pacientes 3 e 23 envolveram genes do complexo citocromo envolvido no metabolismo de drogas e, no caso da *CNV* no paciente 23, existe um caso postado no *DECIPHER* porém sem fenótipo de fenda. As *CNVs* encontradas no paciente 5 envolveram genes codificadores de proteínas ribossômicas (*RPS6KC1*), fatores de *splicing* (*ISY1*), genes de adesão ao DNA (*CNBP*), relacionado a câncer (*FUT8*) e gene codificador de proteína quinase (*TAOK1*). No paciente 6, a *CNV* envolveu um gene codificador de enzima fosforilativa (*PI4K2B*) e no caso do paciente 10 com FL e alterações faciais menores, a *CNV* não envolveu genes, mas está descrita no *DECIPHER*, porém em um caso com quadro de anomalia cardíaca. A *CNV* no paciente 13 envolveu genes cuja função é desconhecida até o momento (*KRBOX1* e *FAM198A*, *FAM69C*) e o gene *CNDP2* de enzima do tipo peptase. Por fim, no paciente 22 a *CNV* encontrada envolveu o gene *FSTL5* (codificador de

proteína extracelular metabolizadora de cálcio) e o gene *DLC1* (relacionado ao câncer de fígado) e os casos postados no *DECIPHER* não apresetam FOT ou não contem o fenótipo associado.

Na busca de *CNVs* nos genes de interesse avaliados nesse estudo, foi encontrado um segmento de 96kb duplicado envolvendo parte do gene *FGFR1* (incluindo intron 16 e exons 16 e 17) no paciente 6 que apresenta FL/P síndrômica. Todas as mutações descritas nesse gene até o momento resultam em mecanismos de ganho de função, o que aumenta a afinidade dos receptores pelos seus ligantes, por isso são chamadas mutações de ativação constitutiva (272). Apesar da frequência de mutações nesse gene serem associadas ao quadro da síndrome de Kallmann (55, 184, 185) o paciente em questão, com exceção da presença de FL/P, não apresentava outros sinais comuns desta síndrome. Assim, é possível que tal alteração seja responsável pelo fenótipo de fenda nesse paciente, principalmente pelo resultado concordante entre os dois *softwares* de análise e pela região identificada como duplicada deste gene não estar documentada em controles na base de dados *DGV*. Entretanto, a confirmação desta alteração por uma técnica independente ainda é necessária, o que será descrito no tópico “Perspectivas”.

7.2.2. Estudo das aberrações cromossômicas

Translocações intersticiais são considerados eventos raros (incidência de 1: 80.000 nascidos vivos) que requerem o envolvimento de no mínimo três quebras cromossômicas (273). Estas translocações podem resultar em alterações fenotípicas por diferentes formas: aumento da expressão dos genes contidos nos seguimentos duplicados; alteração na expressão gênica devido a efeitos posicionais; os genes localizados na região de inserção podem ser deletados, duplicados ou rompidos (274).

O paciente 21 apresentou uma inserção entre os cromossomos 11 e 15, além de uma duplicação na região 8p23.1. A utilização em conjunto de técnicas de citogenética e biologia molecular permitiram caracterizar parcialmente as anomalias cromossômicas e correlacioná-las com os sinais clínicos observados.

Casos de duplicações na região 15qter ou especificamente em 15q25-q26 já foram descritos na literatura. Como visto em nosso paciente, dismorfismos faciais, face alongada e atraso no desenvolvimento são sinais frequentemente descritos (276, 277, 278, 279, 280), como também anomalias renais (274, 279, 280). Dentre os vários genes (~ 70) contidos nesse segmento cromossômico duplicado (Figura 36), está o *IGF1R* (*Insulin-like growth factor receptor 1*). Este gene é um dos receptores de fator de crescimento dependente de insulina que desempenha um importante papel durante o crescimento pré e pós natal (281). Duplicações envolvendo o gene *IGF1R* foram associadas a quadros de crescimento exagerado (274, 276, 279, 280). Entretanto, tal padrão de crescimento não foi observado no paciente estudado, sugerindo que essa alteração não está exclusivamente relacionada a uma alteração de dosagem do gene *IGF1R*, o que também foi salientado no trabalho de Roggenbuck et al. (277).

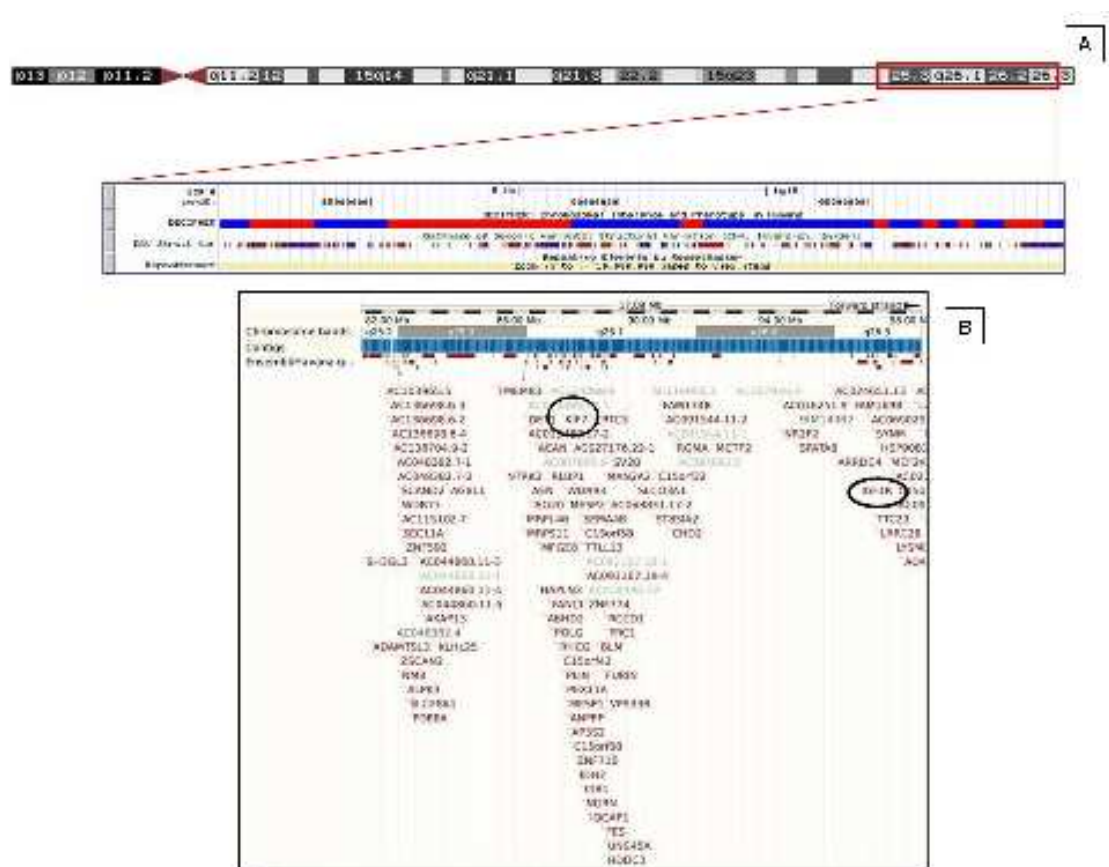


Figura 38. Representação de uma porção do segmento duplicado da região cromossômica 15q25-q26. A) Ideograma do cromossomo 15 indicando a região duplicada (retângulo vermelho) com a

apresentação dos casos do *DECIPHER* e as variações descritas no *DGV* (fonte: *UCSC Genome Browser*). **B)** Genes contidos em uma porção da região duplicada com destaque para os genes *IGF1R* e *KIF7* (fonte: *Ensembl Genome Browser*).

Em um caso com duplicação 15qter, citado acima, o paciente apresentou úvula fendida (277). Na base de dados *DECIPHER* está postado o caso 1584 que apresenta uma duplicação menor do que 350kb dentro da mesma região encontrada no presente paciente (15q26) com FLP, hipertelorismo ocular e retardo do desenvolvimento. Entretanto, duas outras *CNVs* no cromossomo 21 também foram detectadas neste mesmo caso do *DECIPHER*. Em um estudo do tipo análise de ligação em famílias com indivíduos portadores de FL/P não-sindrômica, a região 15q26, dentre outras, foi apontada como candidata a estar associada ao fenótipo (282). Estes relatos levantam a hipótese do envolvimento da região 15q26 no desenvolvimento de fendas. Contido no segmento duplicado, destaca-se o gene *KIF7* como de interesse para fenda já que este gene com atividade quinase desempenha papel na sinalização do gene *SHH* durante a ação regulatória da transcrição do gene *GLI2* (283, 284).

Dentre outros genes contidos nesse segmento duplicado, está o gene *ACAN* ou *AGCI*. Este gene codifica uma proteína membro de uma família de proteoglicanas que é parte integral da matrix extracelular do tecido cartilaginoso (285). Estudos apontaram a associação deste gene, bem como mutações, a quadros de degeneração da espinha vertebral (286, 287, 288). Devido ao falecimento, não será possível avaliar o efeito da duplicação da sequência do *ACAN* no presente paciente pois alterações na espinha vertebral se manifestam com o decorrer da idade. O gene *RLBPI* codifica uma proteína de ligação expressa na retina (289). Na literatura, são frequentes os relatos de patologias que afetam a retina associadas a mutações de sequência neste gene (290, 291, 292, 293, 294) . Entretanto, não há dados sobre efeito de duplicações neste gene e, quanto a alterações oculares, o paciente em questão não apresentou deformações de retina.

Os demais genes contidos na região duplicada estão: ligação protéica (*SH3GL3*), atividade peptase (*ADAMTSL3*, *SEC11A*, *ANPEP*, *FURIN*, *ADAMTS17*), *zinc finger* (*ZSCAN2*, *ZNF592*, *ZNF710*), atividade quinase de proteína (*ALPK3*), proteína ribossômica mitocondrial (*MRPL46*, *MRPS11*) e atividade transmembrana (*SLC28A1*, *RHCG*, *SV2B*).

A inserção (11;15) causou a deleção de parte do gene *ELP4* (contendo o intron e exon 9), localizado a 12 kb do gene *PAX6* (Figura 37). A aniridia é uma anomalia rara caracterizada pela formação incompleta ou até ausência de íris (295). Mutações no gene *PAX6* ou alterações em elementos regulatórios que controlam a expressão deste gene estão associadas à ocorrência aniridia (296). Assim, sugere-se que houve mudança na expressão do gene *PAX6* devido à alteração posicional de algum elemento regulatório causada pela inserção ou a deleção de parte do gene *ELP4*, levando à aniridia no presente paciente. O gene *ELP4* codifica uma das subunidades de um complexo de elongação, composto por seis subunidades, diretamente associado a RNA polimerase 2 durante a elongação transcricional, com papel de elemento regulatório da expressão do gene *PAX6* (297). Outros trabalhos também relatam a ocorrência de aniridia em paciente com deleção envolvendo o gene *ELP4* sem alterações no gene *PAX6* (298, 299, 300, 301). Assim, o caso do presente paciente ressalta o possível papel do gene *ELP4* como elemento regulatório da expressão do gene *PAX6*. Porém, o estudo da expressão deste gene no paciente 21 é inviável, pois os tecidos de expressão limitam-se ao cerebelo, pâncreas e olho (302, 303).

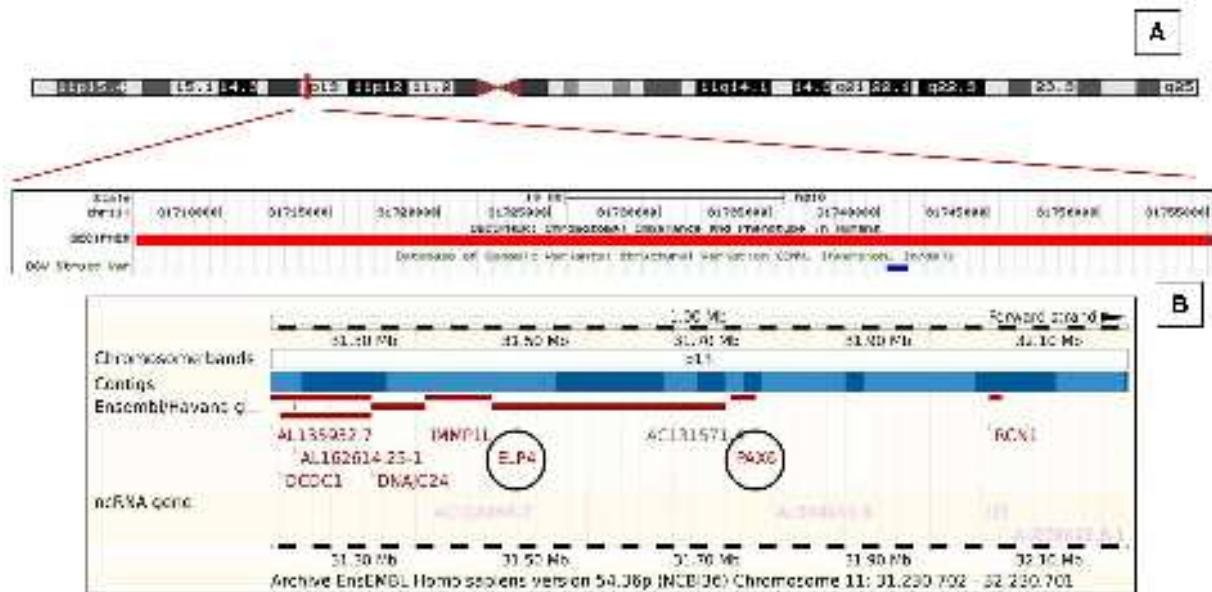


Figura 39. Representação do segmento deletado da região cromossômica 11p13. **A)** Ideograma do cromossomo 11 indicando a região deletada (retângulo vermelho) com a apresentação dos casos do *DECIPHER* e as variações descritas no *DGV* (fonte: *UCSC Genome Browser*). **B)** Genes contidos na região com destaque para os genes *ELP4* e *PAX6* (fonte: *Ensembl Genome Browser*).

O paciente 21 também apresentou uma duplicação de 3,8Mb na região 8p23.1. que, pela análise do cariótipo, parece não estar envolvida com o segmento inserido no cromossomo 11p13. Entretanto, ainda é necessário confirmação pela técnica de *FISH*. Possivelmente, esta alteração está relacionada à presença de anomalia cardíaca nesse paciente, já que este tipo de manifestação é comum em casos de duplicação 8p23.1 (304, 305, 306). Os genes *GATA4* (*GATA binding protein 4*) e *SOX7* (*SRY-related HMG-box7*), localizados na região duplicada, fazem parte de famílias distintas de fatores de transcrição com papel reconhecido na embriogênese do tecido cardíaco (307, 308, 309, 310, 311, 312). O gene *SOX7* está envolvido na regulação de vários processos embrionários, sendo sua expressão observada inclusive na região da cabeça relatada em estudos com ratos mutantes (310). O trabalho de Murakami et al. (313) ressalta a relação entre os genes *GATA4* e *SOX7* com a ativação do gene *FGF3* durante o desenvolvimento embrionário. A família de genes de fatores de crescimento de fibroblasto (*FGF*) é conhecida por sua associação com

casos de FOT (39, 54). Considerando, além disso, que a duplicação 8p23.1 também já foi descrita em um paciente com fenda palatal (305) e a função destes genes, sugere-se que ambos os genes apresentam potencial patogênico no envolvimento com FOT a ser esclarecido em estudos futuros.

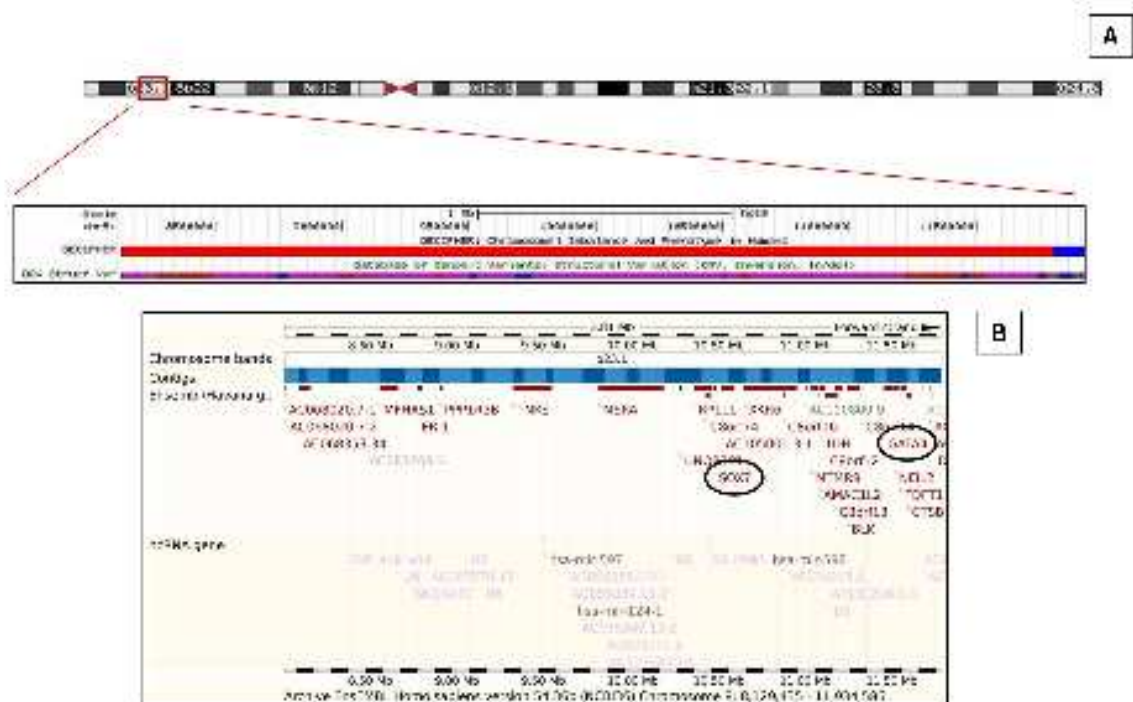


Figura 40. Representação do segmento duplicado da região cromossômica 8p23. **A)** Ideograma do cromossomo 8 indicando a região deletada (retângulo vermelho) com a apresentação dos casos do *DECIPHER* e as variações descritas no *DGV* (fonte: *UCSC Genome Browser*). **B)** Genes contidos na região com destaque para os genes *SOX7* e *GATA4* (fonte: *Ensembl Genome Browser*).

7.2.3. Estudo dos genes candidatos

A análise dos genes candidatos permitiu a caracterização quanto à presença ou não de alterações de sequência destes na presente amostra de portadores de FOT.

Com relação às alterações encontradas nos genes *IRF6*, *MSX2*, *SKI*, *SATB2* e *SPRY1*, a pesquisa em base de dados genômicos como *Ensembl Genome Browser*, *Entrez dbSNP* do *NCBI* e *Human Genome Mutation Database (HGMD)* revelaram que estas se tratavam de *SNPs* já

validados em várias populações pelo consórcio *HapMap* e, até o momento, não existem dados na literatura sobre a associação destes com as FOT. Também constatou-se que nenhum dos indivíduos portadores de FOT da presente casuística possuem as três mutações pesquisadas no gene *FGFR1* já descritas em casos de FOT não-sindrômica (54).

Segundo o trabalho de Zuccherro et al. (110), estima-se que o gene *IRF6* contribua para 12% do total de casos de fenda não-sindrômica. Entretanto, este estudo refere-se à identificação de variantes funcionais nesse gene caracterizadas como marcadores para risco de fenda e salienta que outras alterações, tanto no próprio gene *IRF6* como em outros genes, são necessárias para o desenvolvimento do fenótipo de fenda. Dentre as variantes que evidenciam a ligação do gene *IRF6* com o fenótipo de fenda, destaca-se o estudo do polimorfismo rs2235371 (V274I), localizado no domínio de ligação da proteína (110, 138, 314, 315, 316). Evidências estatísticas apontam para um padrão de segregação do alelo codificador do aminoácido valina nessa posição com o fenótipo de FL/P (110) e para uma relação de fator de proteção para o risco de fenda com o alelo codificador de isoleucina (315, 316). Todos os indivíduos estudados apresentaram o alelo G em homozigose que codifica o aminoácido valina. A única exceção foi o paciente 3 com FLP e dismorfismos secundários que apresentou o genótipo G/A, onde o alelo G é de origem materna (mãe com genótipo G/G) e o alelo A de origem paterna (pai com genótipo A/A). Ambos os pais não apresentam fenda.

O resultado negativo para mutações no gene *IRF6* foi surpreendente no caso paciente 20, com suspeita diagnóstica da síndrome de Pterígeo Poplíteo (SPP) pela conhecida relação do gene *IRF6* com o espectro das síndromes de Van der Woude e Pterígeo Poplíteo (13, 116, 117, 118, 119, 120, 121). Entretanto, é importante salientar que na literatura científica não há dados sobre a porcentagem de pacientes com SPP sem mutações nesse gene.

Apesar do padrão de expressão e de os genes *MSX2*, *SKI* e *SATB2* estarem englobados no grupo de genes com estimativa de 6% de contribuição para etiologia das FOTs, deve-se ressaltar que apenas uma mutação foi descrita em cada gene (58). Portanto, os resultados do presente

estudo evidenciam que mutações nesses três genes, parecem realmente serem limitadas a determinadas famílias com quadro de FOT (39). Da mesma forma, é provável que as três mutações encontradas no gene *FGFR1* sejam restritas as famílias onde foram identificadas (54). Já em relação ao gene *SPRY1*, mesmo considerando o padrão de expressão e estudos com modelos animais (90, 162, 163), a ausência de mutações nesse gene em nossa casuística corrobora os resultados do trabalho de Vieira et al. (58).

No total quatro alterações não descritas em base de dados foram encontradas nos genes *FOXE1*, *GLI2*, *MSX1* e *FGF8*. A alteração no gene *FOXE1* não causa modificação do aminoácido codificado. Por tanto, é possível que esta não seja deletéria. Entretanto, vários estudos indicam a importância de variações sinônimas afetando a expressão de genes e o efeito em condições patogênicas (317). Já para as três alterações não-sinônimas (que causam troca do aminoácido codificado) presentes nos genes *GLI2*, *MSX1* e *FGF8*, testes *in silico* foram aplicados para se estimar o efeito da alteração na proteína codificada. Com relação às trocas Ala32Val no gene *MSX1* e Glu236Lis no gene *FGF8*, os resultados da escala Gratham e dos testes *in silico* Panther, Polyphen e SNPs&GO apontam para um provável efeito não deletério destas alterações nas proteínas codificadas. Entretanto, estes testes apresentaram resultado discordante do programa SFIT que classificou ambas as alterações como não tolerantes, com ressalva para a quantidade limitada de sequências homólogas utilizadas por este programa para o calculo do escore (10 sequências para ambos os genes). Resultados discordantes entre os testes *in silico* também ocorreram com a alteração Leu761Phe no gene *GLI2*. A escala Gratham e os testes Panther e Polyphen estimam que esta troca seja benigna, diferente do provável efeito deletério na proteína codificada estimado pelos programas SFIT e SNPs&GO, novamente com ressalva para a pequena quantidade de sequências homólogas utilizadas para comparação (11 sequências para este gene). Como exposto, os resultados desse tipo de análise foram contraditórios e não podem ser considerados conclusivos já que apenas a investigação experimental do efeito dessas alterações nas proteínas codificadas poderá elucidar as suposições apresentadas.

Assim, para esclarecer se as alterações nestes genes apresentam um efeito deletério com potencial associação ao fenótipo de FOT observado nos pacientes, estudos futuros são necessários. Primeiramente, a investigação destas alterações em um grupo de indivíduos controle, para se avaliar o padrão genotípico na população brasileira e, em seguida, realização de estudos funcionais para avaliar o efeito das alterações na proteína codificada.

Com relação ao paciente 5 com suspeita clínica da síndrome de EEC, foi encontrada uma inserção de 4 nucleotídeos na região 5'UTR no gene *P63* que pode influenciar na transcrição ou tradução deste gene e, deste modo, resultar no quadro fenotípico visto. Entretanto, estudos posteriores são necessários para confirmar tal hipótese. O caso deste paciente evidencia a importância da avaliação clínica diferenciada em pacientes com FOT.

Os resultados deste trabalho exemplificam a diversidade de fatores genéticos envolvidos na etiologia das FOTs e o desenho de estudo evidenciou achados instigantes, que abrirão novas perspectivas de investigação neste grupo de defeitos congênitos.

CONCLUSÕES

8. Conclusões

Considerando os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

1. A triagem de *CNVs* apontou o gene *TCEB3* como possível candidato para estudos futuros em FOT e evidenciou a contribuição do gene *FGFR1*.
2. A verificação do padrão de herança se mostrou uma estratégia eficaz para auxiliar na interpretação quanto potencial patogênico das *CNVs* identificadas nos indivíduos portadores de FOT.
3. A triagem de mutações não detectou alterações patogênicas nos seguintes genes: *IRF6*, *MSX2*, *SKI*, *SPRY1*, *SATB2* e *FGFR1*. Já as alterações não sinônimas encontradas nos genes *FOXE1*, *MSX1*, *GLI2* e *FGF8* são inéditas e o potencial patogênico será avaliado em futuros estudos com população controle e também por estudos funcionais.
4. A alteração encontrada no gene *P63* no caso do paciente 5 reforçou a importância da avaliação clínica dos pacientes portadores de FOT prévia à investigação laboratorial. Ainda, o estudo do paciente 21, portador da inserção *ins(11;15)(p13;q25q26)* e duplicação 8p23.1, evidenciou a importância do uso em conjunto de técnicas de citogenética e biologia molecular para o esclarecimento de alterações cromossômicas complexas, o que também permitiu a correlação com o fenótipo observado.

PERSPECTIVAS

9. Perspectivas

Os resultados encontrados dão origem a estudos futuros. Com relação aos dados de *aGH*, pretende-se aumentar o número de indivíduos controle para um número de 100 amostras para constituir uma base de dados de *CNVs* mais sólida. Posteriormente, os portadores de FOT serão novamente analisados de forma comparativa com os indivíduos controles para a caracterização mais precisa dos dados de *CNVs* nos pacientes. Para isso, as amostras já estão coletadas.

A deleção de 270kb envolvendo o gene *TCEB3* na região 1p36.11 no paciente 2 e a duplicação de 96kb envolvendo o gene *FGFR1* no paciente 6 serão confirmadas pela técnica de PCR em tempo real utilizando o sistema *TaqMan Copy Number Assay* (LifeTechnologies®) com os respectivos assays Hs01894832 e Hs01557068.

As alterações não sinônimas encontradas nos genes *MSX1*, *GLI2* e *FGF8* serão estudadas em uma amostra de no mínimo 200 indivíduos controles para se determinar a frequência dos alelos mutados. No caso da mutação 329C→T no gene *MSX1*, será feita a técnica de PCR seguida de digestão enzimática utilizando a enzima *AvaII*. Já as trocas 2341C →T no gene *GLI2* e 765C →A no gene *FGF8* serão avaliadas pela técnica de sequenciamento direto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. Referências Bibliográficas

- 1- Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet* 2004; 13:73-81.
- 2- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 2011; 12(3):167-78.
- 3- Tolarová MM, Cervenka J. Classification and Birth Prevalence of Orofacial Clefts. *Am J Med Genet* 1998; 75:126–137.
- 4- Marazita ML, Mooney MP. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. *Clin Plastic Surg* 2004; 31:125-140.
- 5- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet* 2009; 374(9703):1773-85
- 6- ECLAMC (Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas) Documento Final. Angra dos Reis: XXXVI ECLAMC; 2004 (Versão eletrônica: Fevereiro 2005, Rio de Janeiro).
- 7- Hsieh EW, Yeh RF, Oberoi S, Vargervik K, Slavotinek AM. Cleft lip with or without cleft palate: frequency in different ethnic populations from the UCSF craniofacial clinic. *Am J Med Genet A* 2007; 143A(19):2347-51.
- 8- Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia Clínica*. 6 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- 9- Cohen MM Jr. Malformations of the Craniofacial Region: Evolutionary, Embryonic, Genetic and Clinical Perspectives. *Am J Med Genet* 2002; 115: 245-268.
- 10- Rice DP. Craniofacial anomalies: from development to molecular pathogenesis. *Curr Mol Med* 2005; 5(7):699-722.

- 11- Bender PL. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs* 2000; 15(4):242-9.
- 12- Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; 71(10):1509-19.
- 13- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de Lima RL, Daack-Hirsch S, Sander A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Lammer EJ, Aylsworth AS, Ardinger HH, Lidral AC, Pober BR, Moreno L, Arcos-Burgos M, Valencia C, Houdayer C, Bahau M, Moretti-Ferreira D, Richieri-Costa A, Dixon MJ, Murray JC. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* 2002; 32(2):285-9.
- 14- Van den Boogaard MJH, Dorland M, Beemer FA et al.. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet* 2000; 24: 342-343.
- 15- Harville EW, Wilcox AJ, Lie RT, Vindenes H, Abyholm F. Cleft lip and palate versus cleft lip only: are they distinct defects? *Am J Epidemiol* 2005; 162(5):448-53.
- 16- Cobourne MT. The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod* 2004; 26(1): 7-16.
- 17- Eppley BL, van Aalst JA, Robey A, Havlik RJ, Sadove AM. The Spectrum of Orofacial Clefting. *Plast Reconstr Surg* 2005; 115(7): 101-114.
- 18- Romitti P, Lidral A, Munger R, Daack-Hirsch S, Burns T, Murray J. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratol* 1999; 59:39-50.
- 19- Little J, Cardy A, Munger RG. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ* 2004; 82:213-218.
- 20- Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15:270-278.

- 21- Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S. Nonsyndromic cleft lip and palate: complex genetics and environmental effects. *Ann Hum Genet* 2001; 65(Pt 6):505-15.
- 22- Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F, Palmieri A, Marchesini J, Carinci P, Caramelli E, Rullo R, Gombos F, Tognon M. Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat* 2004; 24(1):104-5.
- 23- Chevrier C, Perret C, Bahuaud M, Zhu H, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert-Gnansia E, Finnell RH, Cordier S. Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *Am J Med Genet A* 2007; 143(3):248-57.
- 24- Mitchell LE, Risch N. Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis. *Am J Hum Genet* 1992; 51(2):323-32.
- 25- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson e Thompson Genética Médica. 7ª ed, Elsevier Medicina Brasil, 2008.
- 26- Sivertsen A, Wilcox AJ, Skjaerven R, Vindenes HA, Abyholm F, Harville E, Lie RT. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ* 2008; 336(7641):432-4.
- 27- Martelli DR, Bonan PR, Soares MC, Paranaíba LR, Martelli-Júnior H. Analysis of familial incidence of non-syndromic cleft lip and palate in a Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15(6): e898-901.
- 28- Brito LA, Cruz LA, Rocha KM, Barbara LK, Silva CB, Bueno DF, Aguiar M, Bertola DR, Franco D, Costa AM, Alonso N, Otto PA, Passos-Bueno MR. Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. *Am J Med Genet A* 2011; 155A(7):1581-7.
- 29- Christensen K, Fogh-Andersen P. Isolated cleft palate in Danish multiple births, 1970-1990. *Cleft Palate Craniofac J* 1993; 30(5):469-74.

- 30- Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis* 2009; 15(7):437-53.
- 31- Perrotin F, de Poncheville LM, Marret H, Paillet C, Lansac J, Body G. Chromosomal defects and associated malformations in fetal cleft lip with or without cleft palate. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2001; 99:19-24.
- 32- Bergé SJ, Plath H, Van de Vondel PT, Appel T, Niederhagen B, Von Lindern JJ, Reich RH, Hansmann M. Fetal cleft lip and palate: sonographic diagnosis, chromosomal abnormalities, associated anomalies and postnatal outcome in 70 fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 18(5):422-31.
- 33- Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D. A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet* 1998; 63(4):1153-9.
- 34- Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D. A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality--and tolerance of segmental aneuploidy--in humans. *Am J Hum Genet* 1999; 64(6):1702-8.
- 35- Vieira TAP. Investigação citogenética em indivíduos com fendas orofaciais e triagem dos casos informativos para estudos específicos [Tese – Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- 36- Lidral AC, Moreno LM. Progress toward discerning the genetics of cleft lip. *Curr Opin Pediatr* 2005; 17(6):731-9.
- 37- Gorlin RJ, Cohen Jr. MM, Hennekam RCM. *Syndromes of the head and neck*. 4^a ed. New York: Oxford University Press; 2001.
- 38- Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet* 1999; 8:1853-9.
- 39- Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res* 2008; 87(2):119-25.

- 40- Schliekelman P, Slatkin M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. *Am J Hum Genet* 2002; 71:1369-85.
- 41- Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation. *Nat Rev Genet* 2001; 2(6):458-68.
- 42- Stein J, Mulliken JB, Stal S, Gasser DL, Malcolm S, Winter R, Blanton SH, Amos C, Seemanova E, Hecht JT. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families. *Am J Hum Genet* 1995; 57(2):257-72.
- 43- Amos C, Gasser D, Hecht JT. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: new BCL3 information. *Am J Hum Genet* 1996; 59(3):743-4.
- 44- Wyszynski DF, Maestri N, McIntosh I, Smith EA, Lewanda AF, Garcia-Delgado C, Vinageras-Guarneros E, Wulfsberg E, Beaty TH. Evidence for an association between markers on chromosome 19q and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in two groups of multiplex families. *Hum Genet* 1997; 99(1):22-6.
- 45- Blanco R, Suazo J, Santos JL, Paredes M, Sung H, Carreño H, Jara L. Association between 10 microsatellite markers and nonsyndromic cleft lip palate in the Chilean population. *Cleft Palate Craniofac J* 2004; 41(2):163-7.
- 46- Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10(13):1580-94.
- 47- Liu W, Sun X, Braut A, Mishina Y, Behringer RR, Mina M, Martin JF. Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice. *Development* 2005; 132(6):1453-61.
- 48- Juriloff DM, Harris MJ. Mouse Genetic Models of Cleft Lip with or without Cleft Palate Birth. *Defects Research* 2008; 82:63–77.
- 49- Lin JY, Chen YJ, Huang YI, Tang GP, Zhang L, Deng B, Li M, Ma H, Luan RS. Association of bone morphogenetic protein 4 gene polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chinese children. *DNA and Cell Biol* 2008; 27: 601-605.

- 50- Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Association between bone morphogenetic protein 4 gene polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chilean population. *DNA Cell Biol* 2010; 29(2):59-64.
- 51- Abu-Issa R, Smyth G, Smoak I, Yamamura K, Meyers EN. Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. *Development* 2002; 129(19):4613-25.
- 52- Frank DU, Fotheringham LK, Brewer JA, Muglia LJ, Tristani-Firouzi M, Capecchi MR, Moon AM. An Fgf8 mouse mutant phenocopies human 22q11 deletion syndrome. *Development* 2002; 129(19):4591-603.
- 53- Hu D, Marcucio RS, Helms JA. A zone of frontonasal ectoderm regulates patterning and growth in the face. *Development* 2003; 130(9):1749-58.
- 54- Riley BM, Murray JC. Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases. *Am J Med Genet A* 2007; 143A(24):3228-34.
- 55- Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F et al.. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 2003; 33:463-465.
- 56- Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee VK. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* 1998; 19(4):399-401.
- 57- Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Léger J, Lyonnet S, Pelet A, Czernichow P, Chatterjee K, Polak M. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet* 2002; 11(17):2051-9.
- 58- Vieira AR, Ávila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, O'Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, FitzPatrick DR, Jiang

R, Marazita ML, Murray JC. Medical Sequencing of Candidate Genes for Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *PLoS Genetics* 2005; Volume 1, Issue 6:e64.

59- Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Govil M, Daack-Hirsch S, Riley B, Jugessur A, Felix T, Morene L, Mansilla MA, Vieira AR, Doheny K, Pugh E, Valencia-Ramirez C, Arcos-Burgos M. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered* 2009; 68(3):151-70.

60- Mo R, Freer AM, Zinyk DL, Crackower MA, Michaud J, Heng HH, Chik KW, Shi XM, Tsui LC, Cheng SH, Joyner AL, Hui C. Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 1997; 124(1):113-23.

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

62- Ingraham CR, Kinoshita A, Kondo S, Yang B, Sajan S, Trout KJ, Malik MI, Dunnwald M, Goudy SL, Lovett M, Murray JC, Schutte BC. Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). *Nat Genet* 2006; 38(11):1335-40.

63- Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Orioli IM, Castilla EE. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is associated with oral-facial cleft in individuals that originate in South America. *Am J Med Genet A* 2007; 143A(17):2075-8.

64- Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, Christensen K, Boyles AL, Daack-Hirsch S, Trung TN, Bille C, Lidral AC, Murray JC. Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. *PLoS One* 2009; 4(4):e5385.

65- Jiang R, Lan Y, Chapman HD, Shawber C, Norton CR, Serreze DV, Weinmaster G, Gridley T. Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev* 1998; 12(7):1046-57.

- 66- Casey LM, Lan Y, Cho ES, Maltby KM, Gridley T, Jiang R. Jag2-Notch1 signaling regulates oral epithelial differentiation and palate development. *Dev Dyn* 2006; 235(7):1830-44.
- 67- Jagomägi T, Nikopensius T, Krjutskov K, Tammekivi V, Viltrop T, Saag M, Metspalu A. MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci* 2010; 118(3):213-20.
- 68- Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 1994; 6:348-356.
- 69- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubenstein JL, Murray JC. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 1998; 63(2):557-68.
- 70- Alappat S, Zhang ZY, Chen YP. Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res* 2003; 13:429-442.
- 71- Winograd J, Reilly MP, Roe R, Lutz J, Laughner E, Xu X, Hu L, Asakura T, vander Kolk C, Strandberg JD, Semenza GL. Perinatal lethality and multiple craniofacial malformations in MSX2 transgenic mice. *Hum Mol Genet* 1997; 6(3):369-79.
- 72- Celli J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, Newbury-Ecob R, Hennekam RC, Van Buggenhout G, van Haeringen A, Woods CG, van Essen AJ, de Waal R, Vriend G, Haber DA, Yang A, McKeon F, Brunner HG, van Bokhoven H. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 1999; 99(2):143-53.
- 73- Barrow LL, van Bokhoven H, Daack-Hirsch S, Andersen T, van Beersum SE, Gorlin R, Murray JC. Analysis of the p63 gene in classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts. *J Med Genet* 2002; 39(8):559-66.
- 74- Ray AK, Marazita ML, Pathak R, Beever CL, Cooper ME, Goldstein T, Shaw DF, Field LL. TP63 mutation and clefting modifier genes in an EEC syndrome family. *Clin Genet* 2004; 66(3):217-22.

- 75- Suzuki K, Hu D, Bustos T, Zlotogora J, Richieri-Costa A, Helms JA, Spritz RA. Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nat Genet* 2000; 25(4):427-30.
- 76- Sözen MA, Suzuki K, Tolarova MM, Bustos T, Fernández Iglesias JE, Spritz RA. Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *Nat Genet* 2001; 29(2):141-2.
- 77- Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 2002; 61(4):248-56.
- 78- Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Vaccari C, Marchesini J, Pezzetti F, Baciliero U, Padula E, Carinci P, Carinci F. Study of the PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip patients with or without cleft palate. *Ann Hum Genet* 2006; 70(Pt 3):410-3.
- 79- Avila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K, Daack-Hirsch S, Romitti PA, Murray JC. PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *Am J Med Genet A* 2006; 140(23):2562-70.
- 80- Chenevix-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG. Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *Am J Hum Genet* 1992; 51(6):1377-85.
- 81- Vintiner GM, Lo KK, Holder SE, Winter RM, Malcolm S. Exclusion of candidate genes from a role in cleft lip with or without cleft palate: linkage and association studies. *J Med Genet* 1993; 30(9):773-8.
- 82- Mitchell LE. Interpreting the evidence for an association between the retinoic acid receptor locus and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *J Med Genet* 1994; 31(5):425.
- 83- Peanchitlertkajorn S, Cooper ME, Liu YE, Field LL, Marazita ML. Chromosome 17: gene mapping studies of cleft lip with or without cleft palate in Chinese families. *Cleft Palate Craniofac J* 2003; 40(1):71-9.

- 84- FitzPatrick DR, Carr IM, McLaren L, Leek JP, Wightman P, Williamson K, Gautier P, McGill N, Hayward C, Firth H, Markham AF, Fantes JA, Bonthron DT. Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32-q33. *Hum Mol Genet* 2003; 12(19):2491-501.
- 85- Britanova O, Depew MJ, Schwark M, Thomas BL, Miletich I, Sharpe P, Tarabykin V. *Satb2* haploinsufficiency phenocopies 2q32-q33 deletions, whereas loss suggests a fundamental role in the coordination of jaw development. *Am J Hum Genet* 2006; 79(4):668-78.
- 86- Dobрева G, Chahrour M, Dautzenberg M, Chirivella L, Kanzler B, Fariñas I, Karsenty G, Grosschedl R. SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. *Cell* 2006; 125(5):971-86.
- 87- Hu D, Helms JA. The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development* 1999; 126(21):4873-84.
- 88- Berk M, Desai SY, Heyman HC, Colmenares C. Mice lacking the *ski* proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial, patterning, and skeletal muscle development. *Genes Dev* 1997; 11(16):2029-39.
- 89- Colmenares C, Heilstedt HA, Shaffer LG, Schwartz S, Berk M, Murray JC, Stavnezer E. Loss of the *SKI* proto-oncogene in individuals affected with 1p36 deletion syndrome is predicted by strain-dependent defects in *Ski*^{-/-} mice. *Nat Genet* 2002; 30(1):106-9.
- 90- Yang X, Kilgallen S, Andreeva V, Spicer DB, Pinz I, Friesel R. Conditional expression of *Spry1* in neural crest causes craniofacial and cardiac defects. *BMC Dev Biol* 2010; 10:48.
- 91- Alkuraya FS, Saadi I, Lund JJ, Turbe-Doan A, Morton CC, Maas RL. *SUMO1* haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. *Science* 2006; 313(5794):1751.
- 92- Pauws E, Stanier P. FGF signalling and SUMO modification: new players in the aetiology of cleft lip and/or palate. *Trends Genet* 2007; 23(12):631-40.

- 93- Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC. Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009; 85(1):42-51.
- 94- Carter TC, Molloy AM, Pangilinan F, Troendle JF, Kirke PN, Conley MR, Orr DJ, Earley M, McKiernan E, Lynn EC, Doyle A, Scott JM, Brody LC, Mills JL. Testing reported associations of genetic risk factors for oral clefts in a large Irish study population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010; 88(2):84-93.
- 95- Jia ZL, Li Y, Meng T, Shi B. Association between polymorphisms at small ubiquitin-like modifier 1 and nonsyndromic orofacial clefts in Western China. *DNA Cell Biol* 2010; 29(11):675-80.
- 96- Braybrook C, Lisgo S, Doudney K, Henderson D, Marçano AC, Strachan T, Patton MA, Villard L, Moore GE, Stanier P, Lindsay S. Craniofacial expression of human and murine TBX22 correlates with the cleft palate and ankyloglossia phenotype observed in CPX patients. *Hum Mol Genet* 2002; 11(22):2793-804.
- 97- Herr A, Meunier D, Müller I, Rump A, Fundele R, Ropers HH, Nuber UA. Expression of mouse Tbx22 supports its role in palatogenesis and glossogenesis. *Dev Dyn* 2003; 226(4):579-86.
- 98- Marçano AC, Doudney K, Braybrook C, Squires R, Patton MA, Lees MM, Richieri-Costa A, Lidral AC, Murray JC, Moore GE, Stanier P. TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate. *J Med Genet* 2004; 41(1):68-74.
- 99- Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Gen* 1989; 45: 348-353.
- 100- Feng H, Sassani R, Bartlett SP, Lee A, Hecht JT, Malcolm S, Winter RM, Vintiner GM, Buetow KH, Gasser DL. Evidence, from family studies, for linkage disequilibrium between TGFA and a gene for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Am J Hum Genet* 1994; 55(5):932-6.

- 101- Mitchell LE. Transforming growth factor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reappraisal. *Genet Epidemiol* 1997; 14(3):231-40.
- 102 - Machida J, Yoshiura K, Funkhauser CD, Natsume N, Kawai T, Murray JC. Transforming growth factor-alpha (TGFA): genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only. *Genomics* 1999; 61(3):237-42.
- 103- Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 1995; 11(4):409-14.
- 104- Kaartinen V, Cui XM, Heisterkamp N, Groffen J, Shuler CF. Transforming growth factor-beta3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev Dyn* 1997; 209(3):255-60.
- 105- Taya Y, O'Kane S, Ferguson MW. Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. *Development* 1999; 126(17):3869-79.
- 106- Tudela C, Formoso MA, Martínez T, Pérez R, Aparicio M, Maestro C, Del Río A, Martínez E, Ferguson M, Martínez-Alvarez C. TGF-beta3 is required for the adhesion and intercalation of medial edge epithelial cells during palate fusion. *Int J Dev Biol* 2002; 46(3):333-6.
- 107- Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC. MSX1 and TGFB3 Contribute to Clefting in South America. *J Dent Res* 2003; 82(4):289-292.
- 108- Zhu J, Hao L, Li S, Bailey LB, Tian Y, Li Z. MTHFR, TGFB3, and TGFA polymorphisms and their association with the risk of non-syndromic cleft lip and cleft palate in China. *Am J Med Genet A* 2010; 152A(2):291-8.
- 109- Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper ME, Viet le T, Nguyen TD, Hai H, Natsume N, Shimozato K, Marazita ML, Murray JC. In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genet Med* 2004; 6:117-125.

- 110- Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J, Natsume N, Yoshiura K, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Moreno L, Arcos-Burgos M, Lidral AC, Field LL, Liu YE, Ray A, Goldstein TH, Schultz RE, Shi M, Johnson MK, Kondo S, Schutte BC, Marazita ML, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med* 2004; 351:769-780.
- 111- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B, Romitti PA, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Machida J, Natsume N, Murray JC. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 2003; 40:399-407.
- 112- Tongkobpetch S, Siriwan P, Shotelersuk V. MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population. *J Hum Genet* 2006; 51:671–676.
- 113- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:623-55.
- 114- Murray JC, Nishimura DY, Buetow KH, Ardinger HH, Spence MA, Sparkes RS, Falk RE, Falk PM, Gardner RJ, Harkness EM, et al.. Linkage of an autosomal dominant clefting syndrome (Van der Woude) to loci on chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 1990; 46(3):486-91.
- 115- Schutte BC, Bjork BC, Coppage KB, Malik MI, Gregory SG, Scott DJ, Brentzell LM, Watanabe Y, Dixon MJ, Murray JC. A preliminary gene map for the Van der Woude syndrome critical region derived from 900 kb of genomic sequence at 1q32-q41. *Genome Res* 2000; 10(1):81-94.
- 116- de Medeiros F, Hansen L, Mawlad E, Eiberg H, Asklund C, Tommerup N, Jakobsen LP. A novel mutation in IRF6 resulting in VWS-PPS spectrum disorder with renal aplasia. *Am J Med Genet A* 2008; 146A(12):1605-8.
- 117- Paraíba LM, Martelli-Júnior H, Oliveira Swerts MS, Line SR, Coletta RD. Novel mutations in the IRF6 gene in Brazilian families with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med* 2008; 22(4):507-11.

- 118- Yeetong P, Mahatumarat C, Siriwan P, Rojvachiranonda N, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. Three novel mutations of the IRF6 gene with one associated with an unusual feature in Van der Woude syndrome. *Am J Med Genet A* 2009; 149A(11):2489-92.
- 119- Ferrero GB, Baldassarre G, Panza E, Valenzise M, Pippucci T, Mussa A, Pepe E, Seri M, Silengo MC. A heritable cause of cleft lip and palate--Van der Woude syndrome caused by a novel IRF6 mutation. Review of the literature and of the differential diagnosis. *Eur J Pediatr* 2010; 169(2):223-8.
- 120- Malik S, Kakar N, Hasnain S, Ahmad J, Wilcox ER, Naz S. Epidemiology of Van der Woude syndrome from mutational analyses in affected patients from Pakistan. *Clin Genet* 2010; 78(3):247-56.
- 121- Matsuzawa N, Kondo S, Shimozaoto K, Nagao T, Nakano M, Tsuda M, Hirano A, Niikawa N, Yoshiura K. Two missense mutations of the IRF6 gene in two Japanese families with popliteal pterygium syndrome. *Am J Med Genet A* 2010; 152A(9):2262-7.
- 122- Pegelow M, Peyrard-Janvid M, Zucchelli M, Fransson I, Larson O, Kere J, Larsson C, Karsten A. Familial non-syndromic cleft lip and palate--analysis of the IRF6 gene and clinical phenotypes. *Eur J Orthod* 2008; 30(2):169-75.
- 123- Rutledge KD, Barger C, Grant JH, Robin NH. IRF6 mutations in mixed isolated familial clefting. *Am J Med Genet A* 2010; 152A(12):3107-9.
- 124- Jehee FS, Burin BA, Rocha KM, Zechi-Ceide R, Bueno DF, Brito L, Souza J, Leal GF, Richieri-Costa A, Alonso N, Otto PA, Passos-Bueno MR. Novel mutations in IRF6 in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: when should IRF6 mutational screening be done? *Am J Med Genet A* 2009; 149A(6):1319-22.
- 125- Pan Y, Ma J, Zhang W, Du Y, Niu Y, Wang M, Zhang Z, Wang L. IRF6 polymorphisms are associated with nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population. *Am J Med Genet A* 2010; 152A(10):2505-11.

- 126- Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A* 2005; 137A(3):259-62.
- 127- Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Linkage disequilibrium between IRF6 variants and nonsyndromic cleft lip/palate in the Chilean population. *Am J Med Genet A* 2008; 146A(20):2706-8.
- 128- Zannini M, Avantiaggiato V, Biffali E, Arnone MI, Sato K, Pischetola M, Taylor BA, Phillips SJ, Simeone A, Di Lauro R. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J* 1997; 16(11):3185-97.
- 129- Moreno LM, Mansilla MA, Bullard SA, Cooper ME, Busch TD, Machida J, Johnson MK, Brauer D, Krahm K, Daack-Hirsch S, L'heureux J, Valencia-Ramirez C, Rivera D, López AM, Moreno MA, Hing A, Lammer EJ, Jones M, Christensen K, Lie RT, Jugessur A, Wilcox AJ, Chines P, Pugh E, Doheny K, Arcos-Burgos M, Marazita ML, Murray JC, Lidral AC. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Hum Mol Genet* 2009; 18(24):4879-96.
- 130- Trueba SS, Augé J, Mattei G, Etchevers H, Martinovic J, Czernichow P, Vekemans M, Polak M, Attié-Bitach T. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(1):455-62.
- 131- De Felice M, Ovitt C, Biffali E, Rodriguez-Mallon A, Arra C, Anastassiadis K, Macchia PE, Mattei MG, Mariano A, Schöler H, Macchia V, Di Lauro R. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet* 1998; 19(4):395-8.
- 132- Venza I, Visalli M, Parrillo L, De Felice M, Teti D, Venza M. MSX1 and TGF-beta3 are novel target genes functionally regulated by FOXE1. *Hum Mol Genet* 2011; 20(5):1016-25.
- 133- Castanet M, Mallya U, Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Demuth S, Raymond FL, Schwabe J, Gurnell M, Chatterjee VK. Maternal isodisomy for chromosome 9 causing

homozygosity for a novel FOXE1 mutation in syndromic congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(8):4031-6.

134- Ruppert JM, Kinzler KW, Wong AJ, Bigner SH, Kao FT, Law ML, Seuanez HN, O'Brien SJ, Vogelstein B. The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol Cell Biol* 1988; 8(8):3104-13.

135- Hui CC, Slusarski D, Platt KA, Holmgren R, Joyner AL. Expression of three mouse homologs of the Drosophila segment polarity gene cubitusinterruptus, Gli, Gli-2, and Gli-3, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev Biol* 1994; 162(2):402-13.

136- Pan Y, Wang C, Wang B. Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Dev Biol* 2009; 326(1):177-89.

137- Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillessen-Kaesbach G, Roeder ER, Ming JE, Ruiz i Altaba A, Muenke M. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(23):13424-9.

138- Rahimov F, Ribeiro LA, de Miranda E, Richieri-Costa A, Murray JC. GLI2 mutations in four Brazilian patients: how wide is the phenotypic spectrum? *Am J Med Genet A* 2006; 140(23):2571-6.

139- Richieri-Costa A, Ribeiro LA. Holoprosencephaly-like phenotype: clinical and genetic perspectives. *Am J Med Genet A* 2006; 140(23):2587-93.

140- França MM, Jorge AA, Carvalho LR, Costalonga EF, Vasques GA, Leite CC, Mendonça BB, Arnhold JJ. Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(11):E384-91.

- 141- Bertolacini C, Ribeiro-Bicudo L, Petrin A, Richieri-Costa A, Murray J. Clinical findings in patients with GLI2 mutations - phenotypic variability. *Clin Genet*. 2011. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01606.x.
- 142- Davidson D. The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes. *Trends Genet*. 1995; 11(10):405-11.
- 143- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 2000; 24(4):391-5.
- 144- Liu YH, Kundu R, Wu L, Luo W, Ignelzi MA Jr, Snead ML, Maxson RE Jr. Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing Msx2 transgenes in the developing skull. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(13):6137-41.
- 145- Li X, Ma L, Snead M, Haworth I, Sparkes R, Jackson C, Warman M, Mulliken J, Maxson R, Muller U, Jabs E. A mutation in the homeodomain of the MSX2 gene in a family affected with craniosynostosis, Boston type. *Am J Hum Genet* 1993; 53:A213.
- 146- Ma L, Golden S, Wu L, Maxson R. The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the Pro148-->His mutation in the N-terminal arm of the MSX2 homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. *Hum Mol Genet* 1996; 5(12):1915-20.
- 147- Stavnezer E, Gerhard DS, Binari RC, Balazs I. Generation of transforming viruses in cultures of chicken fibroblasts infected with an avian leukosis virus. *J Virol* 1981; 39(3):920-34.
- 148- Sun Y, Liu X, Eaton EN, Lane WS, Lodish HF, Weinberg RA. Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling. *Mol Cell* 1999; 4(4):499-509.
- 149- Atanasoski S, Notterpek L, Lee HY, Castagner F, Young P, Ehrenguber MU, Meijer D, Sommer L, Stavnezer E, Colmenares C, Suter U. The protooncogene Ski controls Schwann cell proliferation and myelination. *Neuron* 2004; 43(4):499-511.

- 150- Amaravadi LS, Neff AW, Sleeman JP, Smith RC. Autonomous neural axis formation by ectopic expression of the protooncogene c-ski. *Dev Biol* 1997; 192(2):392-404.
- 151- Kaufman CD, Martínez-Rodríguez G, Hackett PB Jr. Ectopic expression of c-ski disrupts gastrulation and neural patterning in zebrafish. *Mech Dev* 2000; 95(1-2):147-62.
- 152- Okamoto N, Toribe Y, Nakajima T, Okinaga T, Kurosawa K, Nonaka I, Shimokawa O, Matsumoto N. A girl with 1p36 deletion syndrome and congenital fiber type disproportion myopathy. *J Hum Genet* 2002; 47(10):556-9.
- 153- Mangold E, Reutter H, Birnbaum S, Walier M, Mattheisen M, Henschke H, Lauster C, Schmidt G, Schiefke F, Reich RH, Scheer M, Hemprich A, Martini M, Braumann B, Krimmel M, Opitz C, Lenz JH, Kramer FJ, Wienker TF, Nöthen MM, Diaz Lacava A. Genome-wide linkage scan of nonsyndromic orofacial clefting in 91 families of central European origin. *Am J Med Genet A* 2009; 149A(12):2680-94.
- 154- Szemes M, Gyorgy A, Paweletz C, Dobi A, Agoston DV. Isolation and characterization of SATB2, a novel AT-rich DNA binding protein expressed in development- and cell-specific manner in the rat brain. *Neurochem Res* 2006; 31(2):237-46.
- 155- Gyorgy AB, Szemes M, de Juan Romero C, Tarabykin V, Agoston DV. SATB2 interacts with chromatin-remodeling molecules in differentiating cortical neurons. *Eur J Neurosci* 2008; 27(4):865-73.
- 156- Rosenfeld JA, Ballif BC, Lucas A, Spence EJ, Powell C, Aylsworth AS, Torchia BA, Shaffer LG. Small deletions of SATB2 cause some of the clinical features of the 2q33.1 microdeletion syndrome. *PLoS One* 2009; 4(8):e6568.
- 157- Balasubramanian M, Smith K, Basel-Vanagaite L, Feingold MF, Brock P, Gowans GC, Vasudevan PC, Cresswell L, Taylor EJ, Harris CJ, Friedman N, Moran R, Feret H, Zackai EH, Theisen A, Rosenfeld JA, Parker MJ. Case series: 2q33.1 microdeletion syndrome--further delineation of the phenotype. *J Med Genet* 2011; 48(5):290-8.

- 158- Leoyklang P, Suphapeetiporn K, Siriwan P, Desudchit T, Chaowanapanja P, Gahl WA, Shotelersuk V. Heterozygous nonsense mutation SATB2 associated with cleft palate, osteoporosis, and cognitive defects. *Hum Mutat* 2007; 28(7):732-8.
- 159- Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, Krasnow MA. Sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 1998; 92(2):253-63.
- 160- Gross I, Bassit B, Benezra M, Licht JD. Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem* 2001; 276(49):46460-8.
- 161- Impagnatiello MA, Weitzer S, Gannon G, Compagni A, Cotten M, Christofori G. Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells. *J Cell Biol* 2001; 152(5):1087-98.
- 162- Zhang S, Lin Y, Itäranta P, Yagi A, Vainio S. Expression of Sprouty genes 1, 2 and 4 during mouse organogenesis. *Mech Dev* 2001; 109(2):367-70
- 163- Komisarczuk AZ, Topp S, Stigloher C, Kapsimali M, Bally-Cuif L, Becker TS. Enhancer detection and developmental expression of zebrafish sprouty1, a member of the fgf8 synexpression group. *Dev Dyn* 2008; 237(9):2594-603.
- 164- Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1. *Cell* 2000; 103(7):1099-109.
- 165- Lee H, Habas R, Abate-Shen C. MSX1 cooperates with histone H1b for inhibition of transcription and myogenesis. *Science* 2004; 304(5677):1675-8.
- 166- Roybal PG, Wu NL, Sun J, Ting MC, Schafer CA, Maxson RE. Inactivation of Msx1 and Msx2 in neural crest reveals an unexpected role in suppressing heterotopic bone formation in the head. *Dev Biol* 2010; 343(1-2):28-39.

- 167- Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y. Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development* 2002; 129(17):4135-46.
- 168- Nakatomi M, Wang XP, Key D, Lund JJ, Turbe-Doan A, Kist R, Aw A, Chen Y, Maas RL, Peters H. Genetic interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol* 2010; 340(2):438-49.
- 169- Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa ARS, Ladrail AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet* 2007; 143:538-545.
- 170- Gupta V, Bei M. Modification of Msx1 by SUMO-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345(1):74-7.
- 171- Salahshourifar I, Halim AS, Wan Sulaiman WA, Zilfalil BA. Contribution of MSX1 variants to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in a Malay population. *J Hum Genet* 2011; doi: 10.1038/jhg.2011.95.
- 172- De Muynck S, Schollen E, Matthijs G, Verdonck A, Devriendt K, Carels C. A novel MSX1 mutation in hypodontia. *Am J Med Genet A* 2004; 128A(4):401-3.
- 173- Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB, Fan YT, Zeiger JS, Liang KY, Chiu YF, Vanderkolk CA, Seifert KC, Wulfsberg EA, Raymond G, Panny SR, McIntosh I. A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Ann Epidemiol* 2001; 11(6):434-42.
- 174- Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001; 2(3).
- 175- Yoshiura K, Leysens NJ, Chang J, Ward D, Murray JC, Muenke M. Genomic structure, sequence, and mapping of human FGF8 with no evidence for its role in craniosynostosis/limb defect syndromes. *Am J Med Genet* 1997; 72(3):354-62.
- 176- Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* 1998; 18(2):136-41.

- 177- Bachler M, Neubüser A. Expression of members of the Fgf family and their receptors during midfacial development. *Mech Dev* 2001; 100(2):313-6.
- 178- Richman JM, Lee SH. About face: signals and genes controlling jaw patterning and identity in vertebrates. *Bioessays* 2003; 25(6):554-68.
- 179- Theil T, Dominguez-Frutos E, Schimmang T. Differential requirements for Fgf3 and Fgf8 during mouse forebrain development. *Dev Dyn* 2008; 237(11):3417-23.
- 180- Yaguchi Y, Yu T, Ahmed MU, Berry M, Mason I, Basson MA. Fibroblast growth factor (FGF) gene expression in the developing cerebellum suggests multiple roles for FGF signaling during cerebellar morphogenesis and development. *Dev Dyn* 2009; 238(8):2058-72.
- 181- Zhou YX, Xu X, Chen L, Li C, Brodie SG, Deng CX. A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures. *Hum Mol Genet* 2000; 9(13):2001-8.
- 182- Trokovic N, Trokovic R, Mai P, Partanen J. Fgfr1 regulates patterning of the pharyngeal region. *Genes Dev* 2003; 17(1):141-53.
- 183- Ota S, Tonou-Fujimori N, Tonou-Fujimori N, Nakayama Y, Ito Y, Kawamura A, Yamasu K. FGF receptor gene expression and its regulation by FGF signaling during early zebrafish development. *Genesis* 2010; 48(12):707-16.
- 184- Sato N, Katsumata N, Kagami M, Hasegawa T, Hori N, Kawakita S, Minowada S, Shimotsuka A, Shishiba Y, Yokozawa M, Yasuda T, Nagasaki K, Hasegawa D, Hasegawa Y, Tachibana K, Naiki Y, Horikawa R, Tanaka T, Ogata T. Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(3):1079-88.
- 185- Miura K, Miura S, Yoshiura K, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N, Masuzaki H. A case of Kallmann syndrome carrying a missense mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the

immunoglobulin-like domain IIIb of fibroblast growth factor receptor 1. *Hum Reprod* 2010; 25(4):1076-80.

186- Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, Jacobson-Dickman EE, Eliseenkova AV, Ma J, Dwyer A, Quinton R, Na S, Hall JE, Huot C, Alois N, Pearce SH, Cole LW, Hughes V, Mohammadi M, Tsai P, Pitteloud N. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest* 2008; 118(8):2822-31.

187- Hardelin JP, Dodé C. The complex genetics of Kallmann syndrome: KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROK2, et al.. *Sex Dev* 2008; 2(4-5):181-93.

188- Dodé C, Hardelin JP. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009; 17(2):139-46.

189- Trarbach EB, Abreu AP, Silveira LF, Garmes HM, Baptista MT, Teles MG, Costa EM, Mohammadi M, Pitteloud N, Mendonca BB, Latronico AC. Nonsense mutations in FGF8 gene causing different degrees of human gonadotropin-releasing deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(7):3491-6.

190- Wilkie AO. Craniosynostosis: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet* 1997; 6(10):1647-56.

191- Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Sertié AL, Alonso LG, Kitoh H. Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat* 1999; 14(2):115-25.

192- Passos-Bueno MR, Armelin LM, Alonso LG, Neustein I, Sertié AL, Abe K, Pavanello Rde C, Elkis LC, Koiffmann CP. Craniosynostosis associated with ocular and distal limb defects is very likely caused by mutations in a gene different from FGFR, TWIST, and MSX2. *Am J Med Genet* 2002; 113(2):200-6.

193- Riley BM, Murray JC. Sequence Evaluation of FGF and FGFR Gene Conserved Non-Coding Elements in Non-Syndromic Cleft Lip and Palate Cases. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2007; 143A:3228–3234.

194- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998; 2(3):305-16.

- 195- Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, Ratovitski EA, Jen J, Sidransky D. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(10):5462-7.
- 196- Brunner HG, Hamel BC, Bokhoven Hv H. P63 gene mutations and human developmental syndromes. *Am J Med Genet* 2002; 112(3):284-90.
- 197- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999; 398(6729):714-8.
- 198- Thomason HA, Dixon MJ, Dixon J. Facial clefting in Tp63 deficient mice results from altered Bmp4, Fgf8 and Shh signaling. *Dev Biol* 2008; 321(1):273-82.
- 199- McGrath JA, Duijf PH, Doetsch V, Irvine AD, de Waal R, Vanmolkot KR, Wessagowit V, Kelly A, Atherton DJ, Griffiths WA, Orlow SJ, van Haeringen A, Ausems MG, Yang A, McKeon F, Bamshad MA, Brunner HG, Hamel BC, van Bokhoven H. Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum Mol Genet* 2001; 10(3):221-9
- 200- Bougeard G, Hadj-Rabia S, Faivre L, Sarafan-Vasseur N, Frébourg T. The Rapp-Hodgkin syndrome results from mutations of the TP63 gene. *Eur J Hum Genet* 2003; 11(9):700-4.
- 201- Bertola DR, Kim CA, Albano LM, Scheffer H, Meijer R, van Bokhoven H. Molecular evidence that AEC syndrome and Rapp-Hodgkin syndrome are variable expression of a single genetic disorder. *Clin Genet* 2004; 66(1):79-80
- 202- Yin W, Ye X, Shi L, Wang QK, Jin H, Wang P, Bian Z. TP63 gene mutations in Chinese P63 syndrome patients. *J Dent Res* 2010; 89(8):813-7.
- 203- Sawardekar SS, Zaenglein AL. Ankyloblepharon-ectodermal dysplasia-clefting syndrome: a novel p63 mutation associated with generalized neonatal erosions. *Pediatr Dermatol* 2011; 28(3):313-7.

- 204- Leoyklang P, Siriwan P, Shotelersuk V. A mutation of the p63 gene in non-syndromic cleft lip. *J Med Genet* 2006; 43(6):e28.
- 205- Kantaputra PN, Malaivijitnond S, Vieira AR, Heering J, Dötsch V, Khankasikum T, Sripathomsawat W. Mutation in SAM domain of TP63 is associated with nonsyndromic cleft lip and palate and cleft palate. *Am J Med Genet A* 2011; 155A(6):1432-6.
- 206- Miller OJ, Therman E. *Human Chromosomes*. 4^a ed, New York: Springer Verlag, 2001.
- 207- Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1151:157-66.
- 208- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83(9):2934-8.
- 209- McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2000; 2000:1-14.
- 210- Tonnies H. Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics. *Trends Mol Med*. 2002; 8(6):246-50.
- 211- Beaudet al., Belmont JW. Array-based DNA diagnostics: let the revolution begin. *Annu Rev Med* 2008; 59:113-29.
- 212- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20:399-407.
- 213- Pinkel D, Segreaves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20:207-211.

214- Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004; 41(4):241-8.

215- Schoumans J, Ruivenkamp C, Holmberg E, Kyllerman M, Anderlid BM, Nordenskjöld M. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 2005; 42(9):699-705.

216- Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS, Passos-Bueno MR, Knijnenburg J, Szuhai K, Sloos W, Mazzeu JF, Kok F, Cheroki C, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Varela M, Koiffmann C, Kim CA, Bertola DR, Pearson PL, Rosenberg C. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet Genome Res* 2006; 115(3-4):254-61.

217- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 2006; 43(2):180-6.

218- Carter NP, Fiegler H, Piper J. Comparative analysis of comparative genomic hybridization microarray technologies: report of a workshop sponsored by the Wellcome Trust. *Cytometry* 2002; 49(2):43-8.

219- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP, Carter NP. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36(4):361-74.

220- De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A,

Fischetto R, Previderé C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Gueneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet.* 2007; 44(12):750-62.

221- Fantes JA, Boland E, Ramsay J, Donnai D, Splitt M, Goodship JA, Stewart H, Whiteford M, Gautier P, Harewood L, Holloway S, Sharkey F, Maher E, van Heyningen V, Clayton-Smith J, Fitzpatrick DR, Black GC. FISH mapping of de novo apparently balanced chromosome rearrangements identifies characteristics associated with phenotypic abnormality. *Am J Hum Genet.* 2008; 82(4):916-26.

222- Higgins AW, Alkuraya FS, et al. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. *Am J Hum Genet* 2008; 82(3):712-22.

223- Hester SD, Reid L, Nowak N, Jones WD, Parker JS, Knudtson K, Ward W, Tiesman J, Denslow ND. Comparison of comparative genomic hybridization technologies across microarray platforms. *J Biomol Tech* 2009; 20(2):135-51.

224- LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(13):4181-93.

225- Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. The International HapMap Project Web site. *Genome Research* 2005; 15:1591-1593.

226- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004; 36(9):949-51.

227- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004; 305(5683):525-8.

- 228- Komura D, Shen F, Ishikawa S, Fitch KR, Chen W, Zhang J, Liu G, Ihara S, Nakamura H, Hurles ME, Lee C, Scherer SW, Jones KW, Shapero MH, Huang J, Aburatani H. Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays. *Genome Res* 2006; 16(12):1575-84.
- 229- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al.. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444(7118):444-54.
- 230- Scherer SW, Lee C, Birney E, Altshuler DM, Eichler EE, Carter NP, Hurles ME, Feuk L. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet* 2007; 39(7 Suppl):S7-15.
- 231- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Hum Mol Genet* 2006; 15 Spec No 1:R57-66.
- 232- Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, et al.. Relative Impact of Nucleotide and Copy Number Variation on Gene Expression Phenotypes. *Science* 2007; 315(5813): 848-53.
- 233- Osoegawa K, Vessere GM, Utami KH, Mansilla MA, Johnson MK, Riley BM, L'Heureux J, Pfundt R, Staaf J, Van der Vliet WA, Lidral AC, Schoenmakers EFPM, Borg A, Schutte BC, Lammer EJ, Murray JC, Jong PJ. Identification of novel candidate genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridisation. *J Med Genet* 2008; 45:81-86.
- 234- Leal T, Andrieux J, Duban-Bedu B, Bouquillon S, Brevière GM, Delobel B. Array-CGH detection of a de novo 0.8Mb deletion in 19q13.32 associated with mental retardation, cardiac malformation, cleft lip and palate, hearing loss and multiple dysmorphic features. *Eur J Med Genet* 2009; 52(1):62-6.
- 235- Mitter D, Chiaie BD, Lüdecke HJ, Gillesen-Kaesbach G, Bohring A, Kohlhase J, Caliebe A, Siebert R, Roepke A, Ramos-Arroyo MA, Nieva B, Menten B, Loeys B, Mortier G, Wiczorek D. Genotype-phenotype correlation in eight new patients with a deletion encompassing 2q31.1. *Am J Med Genet A* 2010; 152A(5):1213-24.

- 236- Panganiban G, Rubenstein JL. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Development* 2002; 129(19):4371-86.
- 237- Lu H, Jin Y, Tipoe GL. Alteration in the expression of bone morphogenetic protein-2,3,4,5 mRNA during pathogenesis of cleft palate in BALB/c mice. *Arch Oral Biol* 2000; 45(2):133-40.
- 238- Nie XG. Differential expression of Bmp2, Bmp4 and Bmp3 in embryonic development of mouse anterior and posterior palate. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118(20):1710-6.
- 239- Sahoo T, Theisen A, Sanchez-Lara PA, Marble M, Schweitzer DN, Torchia BS, Lamb AN, Bejjani BA, Shaffer LG, Lacassie Y. Microdeletion 20p12.3 involving BMP2 contributes to syndromic forms of cleft palate. *Am J Med Genet A* 2011; 155A(7):1646-53.
- 240- Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC. Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009; 85(1):42-51.
- 241- Dave BJ, Olney AH, Zaleski DH, Pickering DL, Becker TA, Chipman HE, Sanger WG. Inherited 14q duplication and 21q deletion: a rare adjacent-2 segregation in multiple family members. *Am J Med Genet A* 2009; 149A(10):2248-53.
- 242- Dundar M, Kiraz A, Tasdemir S, Akalin H, Kurtoglu S, Hafo F, Cine N, Savli H. Unbalanced 3;22 translocation with 22q11 and 3p deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 2010; 152A(11):2791-5.
- 243- Lindstrand A, Malmgren H, Verri A, Benetti E, Eriksson M, Nordgren A, Anderlid BM, Golovleva I, Schoumans J, Blennow E. Molecular and clinical characterization of patients with overlapping 10p deletions. *Am J Med Genet A* 2010; 152A(5):1233-43.
- 244- Araújo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra JRG, Farah SB, Mello MP. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 1-13.

- 245- Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 2007; 39(7 Suppl):S48-54.
- 246- Cook Jr EH, Scherer SW. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* 2008; doi:10.1038/nature07458.
- 247- Buysse K, Delle Chiaie B, Van Coster R, Loeys B, De Paepe A, Mortier G, Speleman F, Menten B. Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: lessons learned from a 1001 sample experience. *Eur J Med Genet* 2009; 52(6):398-403.
- 248- Ionita-Laza J, Rogers AJ, Lange C, Raby BA, Lee C. Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics* 2009; 93(1):22-6.
- 249- Koolen DA, Pfundt R, Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Sijm A, Smeets D, Brunner HG, van Kessel AG, Veltman JA, de Vries BB. Genomic Microarrays in Mental Retardation: A Practical Workflow for Diagnostic Applications. *Hum Mutat* 2009; 30(3):283-92.
- 250- MC Pherson MJ, Moller SG. PCR: The basics from background to bench. BIOS Scientific Publishers Limited 2000; pag. 27 a 29.
- 251- Chan PA, Duraisamy S, Miller PJ, Newell JA, McBride C, Bond JP, Raevaara T, Ollila S, Nystrom M, Grimm AJ, Christodoulou J, Oetting WS, Greenblatt MS. Interpreting Missense Variants: Comparing Computational Methods in Human Disease Genes CDKN2A, MLH1, MSH2, MECP2, and Tyrosinase (TYR). *Human Mutation* 2007; 28(7): 683- 693 .
- 252- Grantham R. Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution. *Science, New Series* 1974; 185(4154): 862-864.
- 253- Li WH, Wu CI, Luo CC. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *J Mol Evol* 1984; 21:58 – 71.
- 254- Mi H, Dong Q, Muruganujan A, Gaudet P, Lewis S, Thomas PD. PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(Database issue):D204-10.

- 255- Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human no-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(17):3894-900.
- 256- Xi T, Jones IM, Mohrenweiser HW. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. *Genomics* 2004; 83: 970 – 9.
- 257- Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 2001;11:863 – 74.
- 258- Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat* 2009; 30(8):1237-44.
- 259- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; 25(1):25-9.
- 260- Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Hum Mutat* 2011; 32(4):358-68.
- 261- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(12):e57.
- 262- McGrath JA, Duijf PH, Doetsch V, Irvine AD, de Waal R, Vanmolkot KR, Wessagowit V, Kelly A, Atherton DJ, Griffiths WA, Orlow SJ, van Haeringen A, Ausems MG, Yang A, McKeon F, Bamshad MA, Brunner HG, Hamel BC, van Bokhoven H. Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(3):221-9.

- 263- Celik TH, Buyukcam A, Simsek-Kiper PO, Utine GE, Ersoy-Evans S, Korkmaz A, Yntema HG, Bodugroglu K, Yurdakok M. A newborn with overlapping features of AEC and EEC syndromes. *Am J Med Genet A*. 2011; 155A(12):3100-3.
- 264- Babbs C, Heller R, Everman DB, Crocker M, Twigg SRF, Schwartz CE, Giele H, Wilkie AOM. A new locus for split hand/foot malformation with long bone deficiency (SHFLD) at 2q14.2 identified from a chromosome translocation *Hum Genet* 2007; 122(2):191-9.
- 265- Lezirovitz K, Pedrosa ST, Cotrim MNH, Otto PA, Pearson PL, Mingroni-Netto RC. A novel locus for split-hand/foot malformation associated with tibial hemimelia (SHFLD syndrome) maps to chromosome region 17p13.1–17p13.3. *Hum Genet* 2008; 123(6):625-31.
- 266- Naveed M, Nath SK, Gaines M, Al-Ali MT, Al-Khaja N, Hutchings D, Golla J, Deutsch S, Bottani A, Antonarakis SE, Ratnamala U, Radhakrishna U. Genomewide linkage scan for split-hand/foot malformation with long-bone deficiency in a large Arab family identifies two novel susceptibility loci on chromosomes 1q42.2-q43 and 6q14.1. *Am J Hum Genet* 2007; 80(1):105-11.
- 267- Martelli-Junior H, Porto LV, Martelli DR, Bonan PR, Freitas AB, Della Coletta R. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. *Braz Oral Res* 2007; 21(4):314-7.
- 268- Rittler M, Cosentino V, López-Camelo JS, Murray JC, Wehby G, Castilla EE. Associated anomalies among infants with oral clefts at birth and during a 1-year follow-up. *Am J Med Genet A* 2011; 155A(7):1588-96.
- 269- Yamazaki K, Guo L, Sugahara K, Zhang C, Enzan H, Nakabeppu Y, Kitajima S, Aso T. Identification and biochemical characterization of a novel transcription elongation factor, Elongin A3. *J Biol Chem* 2002; 277(29):26444-51.
- 270- Woo JS, Imm JH, Min CK, Kim KJ, Cha SS, Oh BH. Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. *EMBO J* 2006; 25(6):1353-63.
- 271- Klopocki E, Schulze H, Strauss G, Ott CE, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM, Habenicht R, König R, Seemanova E, Megarbane A,

Ropers HH, Ullmann R, Horn D, Mundlos S. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet.* 2007; 80(2):232-40.

272- Paznekas WA, Cunningham ML, Howard TD, Korf BR, Lipson MH, Grix AW, Feingold M, Goldberg R, Borochowitz Z, Aleck K, Mulliken J, Yin M, Jabs EW. Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations. *Am J Hum Genet* 1998; 62(6):1370-80.

273- Van Hemel JO, Eussen HJ. Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet* 2000; 107(5):415-32.

274- Kang SH, Shaw C, Ou Z, Eng PA, Cooper ML, Pursley AN, Sahoo T, Bacino CA, Chinault AC, Stankiewicz P, Patel A, Lupski JR, Cheung SW. Insertional translocation detected using FISH confirmation of array-comparative genomic hybridization (aCGH) results. *Am J Med Genet A* 2010; 152A(5):1111-26.

275- Nagai T, Shimokawa O, Harada N, Sakazume S, Ohashi H, Matsumoto N, Obata K, Yoshino A, Murakami N, Murai T, Sakuta R, Niikawa N. Postnatal overgrowth by 15q-trisomy and intrauterine growth retardation by 15q-monosomy due to familial translocation t(13;15): dosage effect of IGF1R? *Am J Med Genet* 2002; 113(2):173-7.

276- Faivre L, Gosset P, Cormier-Daire V, Odent S, Amiel J, Giurgea I, Nassogne MC, Pasquier L, Munnich A, Romana S, Prieur M, Vekemans M, De Blois MC, Turleau C. Overgrowth and trisomy 15q26.1-qter including the IGF1 receptor gene: report of two families and review of the literature. *Eur J Hum Genet* 2002; 10(11):699-706.

277- Roggenbuck JA, Mendelsohn NJ, Tenenholz B, Ladda RL, Fink JM. Duplication of the distal long arm of chromosome 15: report of three new patients and review of the literature. *Am J Med Genet A* 2004; 126A(4):398-402.

278- Kant SG, Kriek M, Walenkamp MJ, Hansson KB, van Rhijn A, Clayton-Smith J, Wit JM, Breuning MH. Tall stature and duplication of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Eur J Med Genet* 2007; 50(1):1-10.

279- Tatton-Brown K, Pilz DT, Orstavik KH, Patton M, Barber JC, Collinson MN, Maloney VK, Huang S, Crolla JA, Marks K, Ormerod E, Thompson P, Nawaz Z, Lese-Martin C, Tomkins S, Waits P, Rahman N, McEntagart M. 15q overgrowth syndrome: a newly recognized phenotype associated with overgrowth, learning difficulties, characteristic facial appearance, renal anomalies and increased dosage of distal chromosome 15q. *Am J Med Genet A* 2009; 49A(2):147-54.

280- Zollino M, Tiziano F, Di Stefano C, Neri G. Partial duplication of the long arm of chromosome 15: confirmation of a causative role in craniosynostosis and definition of a 15q25-qter trisomy syndrome. *Am J Med Genet* 1999; 87(5):391-4.

281- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993; 75(1):73-82.

282- Field LL, Ray AK, Cooper ME, Goldstein T, Shaw DF, Marazita ML. Genome Scan for Loci Involved in Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Families From West Bengal, India. *Am J Med Gen* 2004; 130A:265–271.

283- Yamagami S, Evangelista M, Wilson D, Wen X, Theunissen JW, Phamluong K, Davis M, Scales SJ, Solloway MJ, de Sauvage FJ, Peterson AS. The mammalian Cos2 homolog Kif7 plays an essential role in modulating Hh signal transduction during development. *Curr Biol.* 2009; 19(15):1320-6.

284- Putoux A, Thomas S, Coene KL, Davis EE, Alanay Y, Ogur G, Uz E, Buzas D, Gomes C, Patrier S, Bennett CL, Elkhartoufi N, Frison MH, Rigonnot L, Joyé N, Pruvost S, Utine GE, Boduroglu K, Nitschke P, Fertitta L, Thauvin-Robinet C, Munnich A, Cormier-Daire V, Hennekam R, Colin E, Akarsu NA, Bole-Feysot C, Cagnard N, Schmitt A, Goudin N, Lyonnet S, Encha-Razavi F, Siffroi JP, Winey M, Katsanis N, Gonzales M, Vekemans M, Beales PL, Attié-Bitach T. KIF7 mutations cause fetal hydrolethrus and acrocallosal syndromes. *Nat Genet.* 2011; 43(6):601-6.

285- Day JM, Olin AI, Murdoch AD, Canfield A, Sasaki T, Timpl R, Hardingham TE, Aspberg A. Alternative splicing in the aggrecan G3 domain influences binding interactions with tenascin-C and other extracellular matrix proteins. *J Biol Chem.* 2004; 279(13):12511-8.

- 286- Solovieva S, Noponen N, Männikkö M, Leino-Arjas P, Luoma K, Raininko R, Ala-Kokko L, Riihimäki H. Association between the aggrecan gene variable number of tandem repeats polymorphism and intervertebral disc degeneration. *Spine* 2007; 32(16):1700-5.
- 287- Kim NK, Shin DA, Han IB, Yoo EH, Kim SH, Chung SS. The association of aggrecan gene polymorphism with the risk of intervertebral disc degeneration. *Acta Neurochir (Wien)* 2011; 153(1):129-33.
- 288- Cong L, Pang H, Xuan D, Tu GJ. Association between the expression of aggrecan and the distribution of aggrecan gene variable number of tandem repeats with symptomatic lumbar disc herniation in Chinese Han of Northern China. *Spine (Phila Pa 1976)* 2010; 35(14):1371-6.
- 289- Sparkes, R. S., Heinzmann, C., Goldflam, S., Kojis, T., Saari, J. C., Mohandas, T., Klisak, I., Bateman, J. B., Crabb, J. W. Assignment of the gene (RLBP1) for cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) to human chromosome 15q26 and mouse chromosome 7. *Genomics* 1992; 12: 58-62.
- 290- Demirci FY, Rigatti BW, Mah TS, Gorin MB. A novel compound heterozygous mutation in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) in a patient with retinitis punctata albescens. *Am J Ophthalmol.* 2004; 138(1):171-3.
- 291- Nakamura M, Lin J, Ito Y, Miyake Y. Novel mutation in RLBP1 gene in a Japanese patient with retinitis punctata albescens. *Am J Ophthalmol.* 2005; 139(6):1133-5.
- 292- Köhn L, Burstedt MS, Jonsson F, Kadzhaev K, Haamer E, Sandgren O, Golovleva I. Carrier of R14W in carbonic anhydrase IV presents Bothnia dystrophy phenotype caused by two allelic mutations in RLBP1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(7):3172-7.
- 293- Fishman GA, Roberts MF, Derlacki DJ, Grimsby JL, Yamamoto H, Sharon D, Nishiguchi KM, Dryja TP. Novel mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) associated with retinitis punctata albescens: evidence of interfamilial genetic heterogeneity and fundus changes in heterozygotes. *Arch Ophthalmol.* 2004; 122(1):70-5.

- 294- Naz S, Ali S, Riazuddin SA, Farooq T, Butt NH, Zafar AU, Khan SN, Husnain T, Macdonald IM, Sieving PA, Hejtmancik JF, Riazuddin S. Mutations in RLBP1 associated with fundus albipunctatus in consanguineous Pakistani families. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95(7):1019-24.
- 295- Jordan T, Hanson I, Zaletayev D, Hodgson S, Prosser J, Seawright A, Hastie N, van Heyningen V. The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat Genet* 1992; 1(5):328-32.
- 296- Lauderdale JD, Wilensky JS, Oliver ER, Walton DS, Glaser T. 3' deletions cause aniridia by preventing PAX6 gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(25):13755-9.
- 297- Kleinjan DA, Bancewicz RM, Gautier P, Dahm R, Schonthaler HB, Damante G, Seawright A, Hever AM, Yeyati PL, van Heyningen V, Coutinho P. Subfunctionalization of duplicated zebrafish pax6 genes by cis-regulatory divergence. *PLoS Genet* 2008; 4(2):e29.
- 298- Crolla JA, van Heyningen V. Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. *Am J Hum Genet* 2002; 71(5):1138-49.
- 299- D'Elia AV, Pellizzari L, Fabbro D, Pianta A, Divizia MT, Rinaldi R, Grammatico B, Grammatico P, Arduino C, Damante G. A deletion 3' to the PAX6 gene in familial aniridia cases. *Mol Vis* 2007; 13:1245-50.
- 300- Bayrakli F, Guney I, Bayri Y, Ercan-Sencicek AG, Ceyhan D, Cankaya T, Mason C, Bilguvar K, Bayrakli S, Mane SM, State MW, Gunel M. A novel heterozygous deletion within the 3' region of the PAX6 gene causing isolated aniridia in a large family group. *J Clin Neurosci* 2009; 16(12):1610-4.
- 301- Cheng F, Song W, Kang Y, Yu S, Yuan H. A 556 kb deletion in the downstream region of the PAX6 gene causes familial aniridia and other eye anomalies in a Chinese family. *Mol Vis* 2011; 17:448-55.
- 302- Ton CC, Miwa H, Saunders GF. Small eye (Sey): Cloning and characterization of the murine homolog of the human aniridia gene. *Genomics* 1992; 13:251–256.

- 303- Stoykova A, Gruss P. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 1994; 14:1395–1412.
- 304- Kennedy SJ, Teebi AS, Adatia I, Teshima I. Inherited duplication, dup (8) (p23.1p23.1) pat, in a father and daughter with congenital heart defects. *Am J Med Genet* 2001; 104(1):79-80.
- 305- Barber JC, Maloney VK, Huang S, Bunyan DJ, Cresswell L, Kinning E, Benson A, Cheetham T, Wyllie J, Lynch SA, Zwolinski S, Prescott L, Crow Y, Morgan R, Hobson E. 8p23.1 duplication syndrome; a novel genomic condition with unexpected complexity revealed by array CGH. *Eur J Hum Genet* 2008; 16(1):18-27.
- 306- Barber JC, Bunyan D, Curtis M, Robinson D, Morlot S, Dermitzel A, Liehr T, Alves C, Trindade J, Paramos AI, Cooper C, Ocraft K, Taylor EJ, Maloney VK. 8p23.1 duplication syndrome differentiated from copy number variation of the defensin cluster at prenatal diagnosis in four new families. *Mol Cytogenet* 2010; 3:3.
- 307- Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 1993; 13(4):2235-46.
- 308- Molkentin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol* 1994; 14(7):4947-57.
- 309- Huang WY, Cukerman E, Liew CC. Identification of a GATA motif in the cardiac alpha-myosin heavy-chain-encoding gene and isolation of a human GATA-4 cDNA. *Gene* 1995; 155(2):219-23.
- 310- Takash W, Cañizares J, Bonneaud N, Poulat F, Mattéi MG, Jay P, Berta P. SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(21):4274-83.
- 311- Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, Oka T, Sargent MA, York A, Klevitsky R, Vaikunth S, Duncan SA, Aronow BJ, Robbins J, Crombleholme TM, Molkentin JD. Cardiomyocyte GATA4

functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J Clin Invest* 2007; 117(11):3198-210.

312- Cermenati S, Moleri S, Cimbri S, Corti P, Del Giacco L, Amodeo R, Dejana E, Koopman P, Cotelli F, Beltrame M. Sox18 and Sox7 play redundant roles in vascular development. *Blood* 2008; 111(5):2657-66.

313- Murakami A, Shen H, Ishida S, Dickson C. SOX7 and GATA-4 are competitive activators of Fgf-3 transcription. *J Biol Chem* 2004; 279(27):28564-73.

314- Park JW, McIntosh I, Hetmanski JB, Jabs EW, Vander Kolk CA, Wu-Chou YH, Chen PK, Chong SS, Yeow V, Jee SH, Park BY, Fallin MD, Ingersoll R, Scott AF, Beaty TH. Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. *Genet Med* 2007; 9(4):219-27.

315- Jugessur A, Rahimov F, Lie RT, Wilcox AJ, Gjessing HK, Nilsen RM, Nguyen TT, Murray JC. Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway. *Genet Epidemiol* 2008; 32(5):413-24.

316- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, de Assis NA, Diaz-Lacava A, Barth S, Lauster C, Schmidt G, Scheer M, Saffar M, Martini M, Reich RH, Schiefke F, Hemprich A, Pötzsch S, Pötzsch B, Wienker TF, Hoffmann P, Knapp M, Kramer FJ, Nöthen MM, Mangold E. IRF6 gene variants in Central European patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci* 2009; 117(6):766-9.

317- Griseri P, Bourcier C, Hieblot C, Essafi-Benkhadir K, Chamorey E, Touriol C, Pagès G. A synonymous polymorphism of the Tristetraprolin (TTP) gene, an AU-rich mRNA-binding protein, affects translation efficiency and response to Herceptin treatment in breast cancer patients. *Hum Mol Genet* 2011; 20(23):4556-68.

ANEXOS

11. Anexos

ANEXO I. Protocolo de aprovação CEP/Unicamp

	FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
	www.fem.unicamp.br/pesquisa/etica/etica.html
CEP, 30/10/98, (Resolução)	
PARCELO CEP: Nº 714/2008 (Este nº deve ser o mesmo no correspondente relatório sobre o projeto) CAAE: E597.0.146.000-08	
I - IDENTIFICAÇÃO:	
PROJETO: "USO DA TÉCNICA DE SNP ARRAY PARA DETECÇÃO DE VARIACÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS DO DNA (COPY NUMBER VARIATION, CNV) EM DEFECTOS CONGÊNITOS DE HERANÇA COMPLEXA: AS FENDAS ORAIS COMO MODELO".	
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Milena Santoni INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas / UNICAMP	
APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/09/2008	
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 30/11/09 (1) (seu data anterior em 30 de março)	
II - OBJETIVOS	
Contribuir para o esclarecimento e caracterização da mutação genética e consequentemente a herança genética envolvidos na determinação das fendas orais.	
III - SUMÁRIO	
Projeto de protocolo, contendo quatro grupos de indivíduos: (grupo 1) casos familiares de fendas labiais/palatais e palatais não síndrômica, incluindo indivíduos afetados e normais; (grupo 2) casos isolados de fendas labiais/palatais e palatais não síndrômica de causa possível, seus genitores; (grupo 3) casos isolados de fendas labiais/palatais e palatais síndrômica de causa possível, seus genitores; (grupo 4) indivíduos controles, sem história de fenda labial/palatal ou palatal em 3 gerações. Os sujeitos serão recrutados no Ambulatório de Distúrbios da Fala (JRC-UNICAMP), e os normais serão voluntários. Para análise será utilizada o programa GeneCopy Operating Software, (v. 8.0, licenciado pelo FAPESP), autorização do superintendente da instituição, assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, não contendo as itens a, c, d, e, f, g, h, de forma como posta em Resolução CNS/MS 343/04.	
IV - COMENTÁRIOS DOS RELATÓRIOS	
Após a aprovação do Comitê de Ética, o projeto encontra-se adequando-se ao artigo 2º de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	
V - PARCELO CEP	
O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após ouvir os pareceres dos membros relatores previamente designados para o presente caso, e	
Coordenador de Ética em Pesquisa - UNICAMP Rua: Tamanduá, Centro do Campus 129 Cidade: Pádua 13111 1361-961 Campinas, SP	EP007/06/09 1421 4094 FAX: 31051.0021/9187 Supervisor: unicamp.br



mandando todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como se autoriza o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a administração.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo à sua saúde (Res. CNS 196/96 – Item IV 1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em língua por ele assinada (Item IV.2.c).

Resquisitor deve descontinuar a pesquisa conforme determinação no protocolo aprovado e descontinuar a coleta somente após análise das razões de descontinuidade pelo CTE que a aprova (Res. CNS Item III.1.2), exceto quando perceber risco ou dano não previsto no sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime exercido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).

O CTE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que afetem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que fatal) não em outro centro e comunicar ao CTE e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu pareceramento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CTE de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo 1 ou 2 apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CTE, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 196/96, Item III.2.4).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CTE, de acordo com as normas estabelecidas na Resolução CNS-MNS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na 08ª Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de setembro de 2008.

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertazzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FUMUNICAMP

ANEXO II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Responsáveis: Milena Simioni, Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Eu entendo que eu ou meu filho(a) fui(foi) convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Uso da técnica de *SNP array* para detecção de variações no número de cópias do DNA (*copy number variation, CNV*) em defeitos congênitos de herança complexa: as fendas orais como modelo”, envolvendo pessoas com fenda labial com ou sem fenda palatal e pessoas com fenda palatal isolada. O objetivo geral deste estudo é de contribuir para o entendimento e caracterização de como funcionam os genes envolvidos na determinação das fendas labiopalatais. Assim, neste estudo pretende-se investigar alterações no material genético em regiões já descritas como modificadas (mutações já conhecidas) em pessoas com fendas labiopalatais e também identificar outras regiões alteradas. Para isso, técnicas de biologia molecular como *Denaturing High Performace Liquid Chrormatography*, (DHPLC), sequenciamento automático direto e *SNP array*, serão utilizadas.

Caso aceite participar desse estudo, será coletado sangue venoso meu e (ou) do meu filho (a) para posterior extração de DNA. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta. O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço, que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para efetuar tal procedimento. Em alguns casos, será coletada saliva. Neste procedimento, não há nenhum tipo de risco associado ou desconforto aparente. Dependendo dos resultados iniciais, poderemos precisar de outra amostra de sangue para confirmação de dados, realizando cultura de células e verificação dos cromossomos (exames de citogenética).

Entendi que não terei nenhuma vantagem direta com os resultados desta pesquisa e que estes podem demorar alguns anos para serem concluídos. Entretanto, se for de meu interesse e (ou) de minha família e caso eu queira tomar conhecimento, terei acesso a qualquer informação da pesquisa realizada com o meu material genético e (ou) do meu filho(a). Além disso, entendo que todas as consequências dos resultados serão devidamente explicadas a mim em consultada agendada no Ambulatório Dismorfologia Craniofacial do HC/Unicamp ou pelo médico responsável. Dependendo da informação, sei que poderei solicitar consultas adicionais para maiores esclarecimentos ou realizar aconselhamento genético direcionado sem nenhum custo.

Em caso de dúvida ou para informação adicional, poderei contatar os pesquisadores do Departamento de Genética Médica, no telefone (19) 3521.8907, na pessoa da Dra. Vera L. Gil da

Silva Lopes ou na pessoa de Milena Simioni. A fim de facilitar a comunicação, comprometo-me a manter atualizado meu endereço e telefone de contato.

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão sigilosos. O sigilo será mantido em todo o estudo, a partir da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes. Os resultados de exames e testes, bem como do prontuário serão acessíveis apenas aos pesquisadores envolvidos. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

Eu estou ciente que a minha participação neste projeto de pesquisa não me acarretará nenhuma despesa, já que a coleta de material será realizada em minhas consultas regulares à Unicamp ou com meu médico assistente. Entendo, ainda, que o meu acompanhamento médico ou de meu filho(a) não se modificará ou será diferenciado com a minha (nossa) participação ou não neste estudo.

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação ou de minha família no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue do laboratório) sem comprometer os cuidados médicos que minha família recebe atualmente ou venha a receber no HC-Unicamp. No caso de investigações familiares, entendo que o TCLE será obtido de cada indivíduo ou responsável estudado.

Eu confirmo que a Dra. Vera L. Gil da Silva Lopes (ou médico responsável) explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos ou desconfortos advindos desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome e RG do sujeito da pesquisa

Nome e RG do responsável legal

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Data

Fui informado que poderei autorizar que esse material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular/FCM/Unicamp. Caso este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da (s) amostra (s).

Nome e RG do sujeito da pesquisa

Nome e RG do responsável legal

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao responsável pelo participante.

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data

PARTICIPAÇÃO DE INDIVÍDUOS CONTROLES

Eu estou ciente de que a minha participação no estudo intitulado “Uso da técnica de *SNP array* para detecção de variações no número de cópias do DNA (*copy number variation, CNV*) em defeitos congênitos de herança complexa: as fendas orais como modelo” será como um indivíduo controle em testes de biologia molecular.

Entendi que todas as informações constadas neste termo quanto a procedimentos, sigilo, resultados e contatos para resultados (se eu desejar saber), serão iguais aos demais indivíduos não-

controle deste estudo. Fui informado também que poderei autorizar que o meu material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular/FCM/Unicamp. Caso este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da (s) amostra (s).

Nome e RG do indivíduo controle

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Data

ANEXO III. Tabelas com as condições de amplificação dos genes analisados.

Gene *IRF6*

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *IRF6*. TD: ciclo *touch down* de 64°C a 58°C, G: ciclo gradiente.

Exon	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Exon 3	sense: GGCTAGAGCATGAAGTGTA antisense: CATTCTCTCTGTTTCACCAG	500	TD 64 – 58
Exon 4	sense: GCTCTGGGCAATGATAGGAC antisense: AGGCTTTCTTGCTTTATCCA	370	TD 64 – 58
Exon 5	sense: CAGTGAATCTAGGGAGGTCC antisense: GGGACTGATCCTGCTTTCA	436	TD 64 – 58
Exon 6	sense: CAGTGTTTGGTTCTTGTCTA antisense: TTTACTTCTTCCCTGGTGAC	432	TD 64 – 58
Exon 7	sense: GGAAGGATAACTATGGCAG antisense: CTTGACCTCCTCCAGACTAA	664	TD 64 – 58
Exon 8	sense: AAAGATGGTATTTGTTGAGT antisense: GTTTCAGCAAGACTCTAAGG	436	G - 52
Exon 9	sense: CTTCAATCTTGGGTCCATT antisense: GGCATATTTGGAGAATCAC	438	G - 50

Gene *FOXE1*

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *FOXE1*. G: ciclo gradiente.

Exon 1	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Frag 1	sense: CTGAGCTCTCCGCAGAAGG antisense: GTAAGCCGGGTAGGTGGAGA	589	G - 57
Frag 2	sense: GCGGAGGACATGTTTCGAGA antisense: ACGTGCGCCCGTAGAAGT	589	G - 57
Frag 3	sense: CTACCACCACGGCTACCAG antisense: GAACGTGTGAACAGCCGATG	405	G - 59

Gene *GLI2*

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *GLI2*. TD: ciclo *touch down* de 64°C a 58°C, G: ciclo gradiente.

Exon	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Exon 6	sense: CAACATGCTCATCCCTATC antisense: GCCAGACGTAAATCCAGA	438	G - 56
Exon 7	sense: GTTAGCCCAGATGGTCTGTG antisense: CACTCATTATCCATGCAGG	354	G - 56
Exon 8	sense: CTGTGTGCACACCTGTCTC antisense: CGCTTGAACCTGTCCTGT	200	G - 55
Exon 9	sense: CTGCATGCATGTGTTGTG antisense: CATCTCTGGGGGTCTCTT	425	G - 62
Exon 10	sense: CAGCAGGGTGGATGGTCTG antisense: ACAGGCAGGGTGGGAACA	441	G - 56
Exon 11	sense: CCTTAAAATGCATGCTTCTG antisense: CACCTGGCTATCTACTGGAC	391	G - 55
Exon 12	sense: CTACTGACGTTGCCAGCTG antisense: GCCAAGTTGGAGAGAGGAG	536	G - 57
Exon 13	sense: AGTGAAGTGACTTGACCGTT antisense: CCTTTTCTGTACTGGGCTG	663	G - 57
Exon 14.1	sense: AGGCCCAGTGCGATGACT antisense: TGGAGCCTCGTGGGGGAA	676	TD 64-58
Exon 14.2	sense: CATGAGCCTGCGGACCAG antisense: ATTCCACTGCACAGGCATG	712	TD 64-58
Exon 14.3	sense: TGACAACCCCAGACTACCC antisense: GTGATGGCTCTGCTGTGG	700	G - 63
Exon 14.4	sense: ATCGCCACAGGGAAGTTG antisense: TCAGAGCACCCGAGAACAA	700	G - 58
Exon 14.5	sense: AGGGGTCAACCAGGTGTC antisense: GAGCAGAGTATCCAGTATAGC	707	G - 61
Exon 14.6	sense: CTGTTCCGGCTTCTTCAC antisense: GTTGCATTGGAGAAACAGG	698	G - 57
Exon 14.7	sense: GCTGCCCTAGGGATCTCT antisense: GACTGGCAAGGGAAATCCT	736	G - 57

Gene *MSX2*

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *MSX2*. G: ciclo gradiente.

Exons	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Ex 1	sense: CCGCAGCAAAAAAGTTTGAGT antisense: GTACCCTCAGCCCTGGAACAC	542	G - 58
Ex 2	sense: CTTTCAGTTGAGAGGGGAG antisense: GGTTAGCAGAGCAGGAGTAC	652	G - 52

Gene *SKI*

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *SKI*. G: ciclo gradiente.

Exon	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Exon 1a	sense: CCGTGATCGGCCGTGAGC antisense: GTAGGCGCCGCCGTAGAG	735	G - 61
Exon 1b	sense: TCCTCAAAGTCATGGGCATC antisense: GGCCTTCCTACCAAACCTCTCT	681	G - 59
Exon 2 e 3	sense: TCTGACTGCCATGTGCCAG antisense: GAACCAACACCGAGACTGC	650	G - 58
Exon 4	sense: TTCGGAGCTGGGAAAGTC antisense: GAACCTGCGAAACATGGG	489	G - 58
Exon 5	sense: CCCATGTTTCGCAGGTTC antisense: GAGGTGGAGGCAGAGAGGA	521	62
Exon 6	sense: CTCCAGGGCACATTGTCAG antisense: GATCTGAAAGGGAGCCGAGT	677	G - 57
Exon 7	sense: GTCTCGTGAGCCTGTGTCCT antisense: AATGTTCCAGCAAGCAGAGG	616	G - 57

Gene *SATB2*

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *SATB2*. G: ciclo gradiente.

Exons	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Ex 4	sense: CTATCACGTGTATGAGCGG antisense: TAATCAACCTGAACCCTGAC	374	G - 50
Ex 5	sense: CTGTTGCTTCCCTTCTCATC antisense: TATTTAGAAAACATATTCTTCC	333	G - 52
Ex 6	sense: GAGTGGGCCTTGGATGTTG antisense: TGTCCAGAAATTAATAGACAGG	341	G - 52
Ex 7	sense: ATTCTTTAGCATTCTTCTGAAG antisense: TGATAGAGAGTCTACCAATGG	305	G - 52
Ex 8	sense: AGTTCAGTTTACAGGAGAGTG antisense: CGTAAATTGTATCTAAAATGC	337	G - 52
Ex 9	sense: AAAGTATGATAATTCAGTTCTAC antisense: TAACCTATCTCAATTCTGTCC	622	G - 52
Ex 10	sense: GGAAGACAGAAACCACACAC antisense: GGGAAAACACAGTAACTAGTG	358	G - 52
Ex 11	sense: GATAATTTCTGCACAGATGGC antisense: GTTTCTTGGGGTTATTACTG	345	G - 52
Ex 12	sense: ATGTAAGTGATGGCACTGG antisense: GTGGTGTGTGCCACTTGG	372	G - 58
Ex 13	sense: CTTACCTCCAGTGCTAGATAG antisense: TAAAGAAATGAAAGCAGAAAATCC	629	G - 52

Gene *SPRY1*

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *SPRY1*. G: ciclo gradiente.

Exons	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Ex 2.1	sense: GTGATTTGACAGGATTCCC antisense: CACTTCCCACACTGTTTAC	700	G - 51
Ex 2.2	sense: CTGGTCATAGGTCTGAAAGG antisense: GAAGGTGGGAAACAGGGA	635	G - 58

Gene *MSX1*

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *MSX1*. TD: ciclo *touch down* de 64°C a 58°C

Exons	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Ex 1	sense: CCAGTGCTGCGGCAGAAGG antisense: TGGAACCTTCTTCCTGGGTG	684	TD 64 – 58
Ex 2	sense: GGCTGATCATGCTCCAATGC antisense: CACCAGGGCTGGAGGAAT	556	TD 64 – 58

Gene *FGF8*

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *FGF8*. TD: ciclo *touch down* de 64°C a 58°C, G: ciclo gradiente.

Exons	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Ex 1 e 2	sense: ACCCGCACCTCTCCGCT antisense: CGCAGAGTCAGTCCCGGTG	319	TD 64 - 58
Ex 3	sense: CTCTCAACATTTGCTCCGTA antisense: CCCACCCACGCAAGTCGG	243	G - 61
Ex 4	sense: CTGGCGGCTTGGGGCAGT antisense: CGGCCAGTGCAGTTGGGAC	356	G - 59
Ex5	sense: TTTGGAGCAGTTGCTGCTGG antisense: TACCTTGTTGGGATCAGAGCC	300	G - 57
Ex 6	sense: GGGTGCCACCTGCTGTCT antisense: TCTCTGCGGTCTGGCATTGT	417	G - 59

Gene *FGFR1*

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *FGFR1*. G: ciclo gradiente.

Exons	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Ex 13	sense: CCTAGCTAGAACTTGCCATG antisense: CCAGAAGCCAGAAAATAAGG	456	G - 52
Ex 14	sense: CTGGCCTACCATGGTCTTTG antisense: CTTGAGAGGCACCCCATCT	490	G - 56
Ex 17	sense: CTAAGAGGAGGCAGGAGATG antisense: GCTCCTGACTCTGCAGTTC	483	G - 60

Gene P63

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *P63*. G: ciclo gradiente.

Exons	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Ex 1	sense: AGAAACGCTCCGCCTCT antisense: AAATGGGAAGATTCGCTTCA	474	G - 55
Ex 2-3	sense: TCCATTGGAGTGGAGGAGTC antisense: CAGCCACCACAGAAAACATT	458	G - 55
Ex 4	sense: GTGAAGTGCTTCCGACGTG antisense: TTTCCACCATGAACATGGAAT	490	G - 55
Ex 5-6	sense: AGCCTCAGCTTCTTCATGCT antisense: ATGCCCACAGAATCTTGACC	537	G - 55
Ex 7	sense: TTGCCCTTTTAGGAGGAAGC antisense: GTGAAATGCCTTGAGGACCA	533	G - 55
Ex 8	sense: CAGCAAGATAACGGGCTTTC antisense: TCCTTTCCCATTGTCACAGA	507	G - 55
Ex 9	sense: TGTTTCCTTCTTTCCTTCTGC antisense: TGTGTATGGACCAGGCATATAGA	464	G - 57
Ex 10	sense: AGCCTCGCAGTCAGTTTCTC antisense: GTCAGAAACCCAAGCCACTC	504	G - 57
Ex 11	sense: AAGCAGAGAAAGGGGAGGAA antisense: AACTCCAACCACAGGACTGC	520	G - 58
Ex 12	sense: AATCGCTGATCTGCAGGAAT antisense: ATAGGTTGAGGCCTGGGAAT	505	G - 57
Ex 13	sense: TGCCTTTGTGCTTAGTTCC antisense: AAGCAGGAGTGCTTTTAGGG	543	G - 57
Ex 14	sense: GCCTTATCCCATTTCTTCCTC antisense: TAGTGGCTTTGTGCCTTGA	485	G - 57

Gene *PAX6*

Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *PAX6*. G: ciclo gradiente.

Exons	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	T _m (°C)
Ex 1	sense: TCATATTCAAACAAACGGACC antisense: AAGAGTGTGGGTGAGGGAAGT	368	G - 55
Ex 2-3	sense: TTATCTCTCACTCTCCAGCCG antisense: GGAGACCTGTCTGAATATTGC	307	G - 55
Ex 3	sense: TGTGGGTGTAATGCTGGGACT antisense: GAATATCCCCAATCTGTTTCCC	408	G - 57
Ex 4	sense: TTGGGAGTTCAGGCCTACCT antisense: CCAGTATCGAGAAGAGCCAAG	324	G - 57
Ex 5	sense: TCTTCTTCCTCTTCACTCTGC antisense: TGAAAGAGATAGGGAAGGATG	392	G - 55
Ex 6-7	sense: ATTTATCTACTTCGTTTTGATGC antisense: AGAGGGTGGGAGGAGGTAAAG	633	G - 58
Ex 8	sense: AGCTGAGATGGGTGACTGTGT antisense: AAGGGATGCCACTATGGAGAG	282	G - 57
Ex 9	sense: GGGAATGTTTTGGTGAGGCT antisense: ACCTCCAACCAATTCCCTTTA	5164	G - 58
Ex 10	sense: GGAACCAGTTTGATGCACAGT antisense: GCAGCAGAGCATTTAGCAGAC	302	G - 58
Ex 11-12	sense: GTCTGCTAAATGCTCTGCTGC antisense: AGCTCTCAAGGGTGCAGACAC	578	G - 59
Ex 13	sense: TGGCTGTGTGATGTGTTCTC antisense: AGAAAACCTTGCACTCTCAGGC	461	G - 59
Ex 14	sense: CCATGTCTGTTTCTCAAAGGGA antisense: CCCCAGTGGTACAATACAGGA	295	G - 59