



*TÂNIA KAWASAKI DE ARAUJO*

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *OPENARRAY* PARA  
INVESTIGAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS A FENDAS  
LABIOPALATAIS EM AMOSTRA DA POPULAÇÃO  
BRASILEIRA

CAMPINAS

2015

i





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

*TÂNIA KAWASAKI DE ARAUJO*

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *OPENARRAY* PARA  
INVESTIGAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS A FENDAS  
LABIOPALATAIS EM AMOSTRA DA POPULAÇÃO  
BRASILEIRA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em  
Ciências Médicas na área de concentração em Ciências  
Biomédicas.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Rodrigo Secolin

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELA ALUNA TÂNIA KAWASAKI DE ARAUJO, E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. VERA LÚCIA GIL DA SILVA LOPES.

CAMPINAS

2015

iii

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Ar15u Araujo, Tânia Kawasaki de, 1985-  
Utilização da técnica de Open Array para investigação de genes associados a fendas labiopalatais em amostra da população brasileira / Tânia Kawasaki de Araujo. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Vera Lúcia Gil da Silva Lopes.  
Coorientador: Rodrigo Secolin.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fenda labial. 2. Fissura palatina. 3. Estudos de casos e controles. 4. Gene KIF7. 5. Gene TCEB3. I. Lopes, Vera Lúcia Gil da Silva, 1967-. II. Secolin, Rodrigo. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Association study between genes and cleft lip and palate in Brazilian population using the openarray technique

**Palavras-chave em inglês:**

Cleft lip  
Cleft palate  
Case-control studies  
Genes, KIF7  
Genes, TCEB3

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Doutora em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Vera Lúcia Gil da Silva Lopes [Orientador]  
Lucimara Teixeira das Neves  
Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo  
Monica Barbosa de Melo  
Claudia Vianna Maurer Morelli

**Data de defesa:** 27-02-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**

**TÂNIA KAWASAKI DE ARAUJO**

Orientador (a) PROF(A). DR(A). VERA LÚCIA GIL DA SILVA LOPES

Coorientador (a) PROF(A). DR(A). RODRIGO SECOLIN

**MEMBROS:**

1. PROF(A). DR(A). VERA LÚCIA GIL DA SILVA LOPES



2. PROF(A). DR(A). LUCIMARA TEIXEIRA DAS NEVES



3. PROF(A). DR(A). LUCILENE ARILHO RIBEIRO BICUDO



4. PROF(A). DR(A). MONICA BARBOSA DE MELO



5. PROF(A). DR(A). CLAUDIA VIANNA MAURER MORELLI



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

**Data: 27 de fevereiro de 2015.**



## **RESUMO**

A fenda labiopalatal (FLP) isolada é o defeito craniofacial mais comum em humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar associações entre 39 genes e a etiologia de FLP isolada em uma amostra da população brasileira. Este estudo de associação do tipo caso-controle foi desenhado com um poder estatístico de 81,29% por meio de regressão logística. O grupo de casos foi composto por 182 pacientes com FLP isolada registrados na Base Brasileira de Dados Clínicos e Familiares de Fendas Orofaciais Típicas. O grupo controle foi formado por 355 indivíduos saudáveis, sem história de fendas orais em três gerações. Toda a amostra foi genotipada por meio do sistema *OpenArray®TaqMan™* para 253 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em 39 genes, incluindo dois genes que, recentemente, haviam sido descritos por este grupo de pesquisa. A seleção de SNPs foi feita com o programa *SNPbrowser 4.0 (Applied Biosystems)* para verificar o número e a localização dos SNPs apropriados para explorar a associação de cada gene com FLP isolada. A análise de associação foi realizada por meio de regressão logística e regressão *stepwise*. Os resultados foram corrigidos para múltiplos testes (correção de Bonferroni). Vinte e quatro SNPs em 16 genes foram significativamente associados com a etiologia da FLP isolada, incluindo *MSX1*, *SPRY1*, *MSX2*, *PRSS35*, *TFAP2A*, *SHH*, *VAX1*, *TBX10*, *WNT11*, *PAX9*, *BMP4*, *JAG2*, *AXIN2*, *DVL2*, *KIF7* e *TCBE3*. A análise de regressão *stepwise* revelou que 11 genes contribuíram em 15,5% do fenótipo de FLP isolada nessa amostra. Este é o primeiro estudo a associar os genes *KIF7* e *TCEB3* à FLP isolada.

**Palavras-chave:** Fenda labiopalatal isolada. Estudo de associação do tipo caso-controle. *KIF7*. *TCEB3*.



## ***ABSTRACT***

Nonsyndromic cleft lip and palate (NSCLP) is the most common craniofacial birth defect. The aim of this study was to evaluate associations between 39 genes and the etiology of NSCLP in a Brazilian population. This case-control association study was designed with 81.29% statistical power according to logistic regression. The case group was composed of 182 patients with NSCLP enrolled in the Brazilian Database on Orofacial Clefts. The controls included 355 healthy individuals with no history of oral clefting in the past three generations. All samples were genotyped by TaqMan®OpenArray™ system for 253 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 39 genes, including two that had recently been associated with this process. The SNPs selection was made by SNPbrowser 4.0 (Applied Biosystems) in order to establish the best SNPs to explore the association between each gene and NSCLP. The association analysis was performed using logistic regression and stepwise regression. The results were corrected for multiple testing (Bonferroni correction). Twenty-four SNPs in 16 genes were significantly associated with the etiology of NSCLP, including *MSX1*, *SPRY1*, *MSX2*, *PRSS35*, *TFAP2A*, *SHH*, *VAX1*, *TBX10*, *WNT11*, *PAX9*, *BMP4*, *JAG2*, *AXIN2*, *DVL2*, *KIF7* and *TCBE3*. Stepwise regression analysis revealed that 11 genes contributed to 15.5% of the phenotype of NSCLP in the sample. This is the first study to associate *KIF7* and *TCEB3* with NSCLP.

**Key words:** Nonsyndromic cleft lip and cleft palate, case-control association study. *KIF7*.  
*TCEB3*



## *SUMÁRIO*

DEDICATÓRIA.....	xvii
AGRADECIMENTOS .....	xix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	xxi
LISTA DE TABELAS .....	xxv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xxvii
APRESENTAÇÃO.....	xxxv
INTRODUÇÃO.....	1
1.Classificações e epidemiologia.....	1
2.Desenvolvimento craniofacial .....	5
2.1. Desenvolvimento do lábio e do palato .....	6
2.2.Base embriológica da fenda labial e palatal .....	9
3. Etiologia .....	11
3.1.Fatores predominantemente ambientais .....	11
3.2.Fatores predominantemente genéticos.....	14
3.2.1. Genes candidatos e vias envolvidas na etiologia de FLP .....	15
3.2.1.1. Fatores de sinalização extracelular.....	15
3.2.1.1.1. Superfamília TGF- $\beta$ .....	16
3.2.1.1.2. Fatores de crescimento de fibroblastos .....	18

3.2.1.1.3. <i>SHH</i> .....	20
3.2.1.1.4. WNT .....	21
3.2.1.1.5. Fatores de transcrição. ....	22
3.2.1.1.5.1. <i>IRF6</i> .....	23
3.2.1.1.5.2. <i>FOXE1</i> .....	25
3.2.1.1.5.3. Fatores de transcrição T-box .....	25
3.2.1.1.5.4. <i>MSX1</i> .....	26
3.2.1.1.5.5. <i>VAX1</i> .....	27
3.2.1.1.5.6. <i>JAG2</i> .....	27
3.2.1.1.5.7. <i>PAX9</i> .....	28
3.2.1.2. Modificação de proteínas.....	29
3.2.1.2.1. <i>SUMO</i> .....	29
3.2.1.3. Outros genes e loci candidatos .....	29
3.2.1.3.1. Região 19q13.1 .....	29
3.2.1.3.2. <i>RARA</i> .....	31
3.2.1.3.3. <i>ERBB2</i> .....	31
3.2.1.3.4. <i>AXIN2</i> .....	32
4. Metodologias para o estudo de FLP isolada.....	33
4.1. Plataforma <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>OpenArray</i> <sup>™</sup> <i>Genotyping</i> .....	38
OBJETIVO. ....	45
1. Objetivo Geral.....	45
2. Objetivo Específico.....	45
CASUÍSTICA e MÉTODOS .....	47

1. Desenho do estudo .....	47
2. Estimativa da estratificação da amostra.....	48
3. Genotipagem.....	49
3.1.Etapas.....	49
3.1.1.Seleção dos polimorfismos e genes .....	50
3.1.2.Desenho e síntese das lâminas.....	52
3.1.3.Coleta e extração das amostras .....	53
3.1.4.Verificação da concentração e pureza das amostras.....	53
3.1.5.Diluição das amostras.....	54
3.1.6.Realização dos experimentos utilizando a plataforma <i>TaqMan®OpenArray™</i> <i>Genotyping</i> .....	54
3.1.6.1.Preparo de amostras.....	55
3.1.6.2.Distribuição das amostras nas lâminas de <i>OpenArray®</i> .....	56
3.1.6.3.Inserção da lâmina de <i>OpenArray®</i> na <i>case</i> .....	57
3.1.6.4.Selagem das <i>cases</i> .....	57
3.1.6.5.Termociclagem.....	58
3.1.6.6.Leitura das lâminas de <i>OpenArray®</i> .....	59
3.1.7.Análise dos dados .....	60
4. Análise estatística .....	61
5. Análise de predição de mutações <i>in silico</i> .....	62
RESULTADOS .....	63
1. Genotipagem.....	63
2. Estimativa da estratificação da amostra.....	64

3. Resultados de associação genética .....	66
4. Análise de predição de mutações <i>in silico</i> .....	69
DISCUSSÃO .....	71
CONCLUSÃO .....	83
REFERÊNCIAS .....	85
APÊNDICES .....	121
APÊNDICE I. Genes e SNPs selecionados para serem genotipados na amostra.....	121
APÊNDICE II. Estimativa dos valores de desequilíbrio de ligação entre os SNPs em termos de $r^2$ para os genes (I- <i>BCL3</i> , II- <i>FGF22</i> , III- <i>HOXA2</i> , IV- <i>MSX1</i> , V- <i>APOC2</i> , VI- <i>BMP4</i> , VII- <i>SPRY1</i> , VIII- <i>VAX1</i> , IX- <i>MSX2</i> , X- <i>WNT8A</i> , XI- <i>KIF7</i> , XII- <i>SPRY2</i> , XIII- <i>TCEB3</i> , XIV- <i>JAG2</i> , XV- <i>SUMO1</i> , XVI- <i>TBX10</i> , XVII- <i>SOX7</i> , XVIII- <i>TFAP2A</i> , XIX- <i>TGFB1</i> , XX- <i>TBX1</i> , XXI- <i>ERBB2</i> , XXII- <i>IRF6</i> , XXIII- <i>LHX8</i> , XXIV- <i>PTCH1</i> , XXV- <i>WNT5A</i> , XXVI- <i>RARA</i> , XXVII- <i>WNT9B</i> , XXVIII- <i>PRSS35</i> , XXIX- <i>AXIN2</i> , XXX- <i>CLPTM1</i> , XXXI- <i>GREM1</i> , XXXII- <i>PAX9</i> , XXXIII- <i>TGFB3</i> , XXXIV- <i>WNT3A</i> , XXXIV- <i>WNT3A</i> , XXXVI- <i>DVL2</i> , XXXVII- <i>TBX22</i> .....	127
ANEXOS .....	141
ANEXO I. Nomenclatura e as definições clínicas adotadas pela <i>International Clearinghouse for Birth Defects and Surveillance and Research</i> para a descrição e classificação das fendas orofaciais (ICBDSR 2007) .....	141
ANEXO II. Parecer do Comitê de Ética.....	143
ANEXO III. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	146
ANEXO IV. Protocolo de extração de DNA por Kit (Quiagen).....	151
ANEXO V. Protocolo de extração de DNA pelo método Fenol-Clorofórmio.....	153

ANEXO VI. Protocolo de purificação do <i>kit MilliUni</i> .....	155
ANEXO VII. Protocolo para realização do ensaio de <i>Open Array</i> .....	156



*Dedico este trabalho aos meus pais Lázaro e Hisako,  
as minhas irmãs Taciana e Priscila por todo o amor  
e apoio em todos os momentos da minha vida.*



## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus pais Lázaro e Hisako e as minhas irmãs Taciana e Priscila, por estarem sempre ao meu lado.*

*Ao meu cunhado, Fernando, por estar ao meu lado desde a graduação me apoiando.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, por todo aprendizado e dedicação durante estes seis anos e pela confiança que teve em mim para a realização deste trabalho.*

*Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rodrigo Secolin, por todo aprendizado e dedicação durante estes quatro anos.*

*Aos professores do Dept. de Genética Médica, por todo o conhecimento compartilhado.*

*Aos funcionários do Laboratório de Citogenética Humana e do Laboratório de Genética Molecular, Nilma, Marilza, Luciana e Madá, por todos os momentos que me auxiliaram durante estes anos.*

*A todos os meus amigos por estarem presentes no meu caminho, me apoiando em todos os momentos.*

*Em especial, nessa fase da minha vida, agradeço a: Renata, Miriam, Ilária, Ana Paula, Luciana, Stephanie, Alexandre, Társis, Fernando, Matheus, Isabella, Roby, Simone, Fábio, Taty, Karina, Marcella, Daniel, Ana Laura, Elaine, Joana, Bruna, Roberta, Fernanda e Alexandra. Obrigada por me ajudarem na realização deste trabalho e, principalmente, pelo apoio e pelos momentos que compartilhamos.*

*Enfim, a todos aqueles que me ajudaram sem os quais não conseguiria obter este resultado.*

*À Banca Examinadora, pela contribuição na elaboração da minha tese.*

*Às famílias e voluntários participantes da pesquisa, pela compreensão e incentivo.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Diagramas esquemáticos do desenvolvimento do lábio e palato em humanos. (A) Desenvolvimento da proeminência frontonasal, do par de processos maxilares, do par de processos mandibulares que rodeiam a cavidade oral na quarta semana do desenvolvimento embrionário. (B) Na quinta semana, os orifícios nasais se formaram, o que leva à formação do par de processos nasais laterais e medial. (C) Os processos nasais mediais se fundiram com os processos maxilares para formar o lábio superior e palato primário até o final da sexta semana. Os processos nasais laterais formam a asa do nariz. Da mesma forma, os processos mandibulares se fundem para formar o maxilar inferior. (D) Durante a sexta semana de embriogênese, o palato secundário se desenvolve como consequência bilateral dos processos maxilares, que crescem verticalmente para baixo do lado da língua. (E) Posteriormente, os processos palatais elevam a uma posição horizontal acima da língua, entram em contato um com o outro e começam a se fundir. (F) Fusão dos processos palatais, em última análise divide o espaço oronasal em duas cavidades, oral e nasal (7).....8
- Figura 2.** Ilustração da lâmina de *OpenArray*<sup>TM</sup>, contendo os 48 *subarrays* e, em destaque, a esquematização de um *subarray* com 64 poços, cada um apresentando o volume de 33nL (Modificado de *Applied BioSystems*, 213).....39
- Figura 3.** Ilustração de uma sonda *TaqMan MGB*. F - Fluorofóro e Q - *Quencher* não fluorescente (supressor).....40
- Figura 4.** Representação esquemática de resultados de hibridização e não hibridização entre as sequências de sonda e a sequência alvo em ensaios de *OpenArray*<sup>®</sup> (Adaptado de *AppliedBioSystems*,213).....41

<b>Figura 5.</b> Plataforma <i>TaqMan® OpenArray™ (Applied BioSystems)</i> .....	42
<b>Figura 6.</b> Ilustração da placa 384 poços de amostras e esquema de sua distribuição na lâmina de <i>OpenArray®</i> .....	55
<b>Figura 7.</b> Foto do interior do equipamento <i>OpenArray® AccuFill™ System</i> .....	56
<b>Figura 8.</b> Foto das <i>cases</i> preparadas (a) e depois com as lâminas já inseridas na <i>case</i> (b)..	57
<b>Figura 9.</b> Foto da selagem das <i>cases</i> na estação de selagem.....	58
<b>Figura 10.</b> (a) Foto do termociclador <i>Dual Flat Block GeneAmp® PCR System 9700 (Applied BioSystems)</i> ; (b) Interior do termociclador com as lâminas.....	59
<b>Figura 11.</b> a) Foto do equipamento <i>OpenArray™ MNT Cyclor</i> acoplado a um computador; b) Foto do interior do <i>OpenArray™ MNT Cyclor</i> com as lâminas já posicionadas.....	60
<b>Figura 12.</b> Visão geral do programa <i>TaqMan® Genotyper</i> .....	61
<b>Figura 13.</b> A) Resultados da análise da frequência do menor alelo (MAF). B) Resultados da análise de equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> .....	63
<b>Figura 14.</b> Gráficos mostrando a ancestralidade de cada indivíduo no grupo de casos com FLP (a) e no grupo controle (b).....	65
<b>Figura 15.</b> Resultados da análise de regressão logística, onde cada ponto representa um SNP. Os SNPs acima da linha cheia ( $-\ln(p\text{-value}) > 3,00$ ), indicam os SNPs com associação genética estatisticamente significativa para o fenótipo. Gráfico A - baseado na análise por Bonferroni, e gráfico B - baseado na análise por FDR.....	66
<b>Figura 16.</b> Resultado da análise de regressão <i>stepwise</i> .....	68
<b>Figura 17.</b> Esquema de articulação entre vários genes envolvidos na etiologia de FLP.....	78





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Formatos oferecidos para a elaboração das lâminas de genotipagem.....	43
<b>Tabela 2.</b> Lista de genes selecionados e o número de SNPs genotipados por gene.....	51
<b>Tabela 3.</b> Resultados da análise de regressão logística e característica dos SNPs associados com FLP isolada nesse estudo.....	67
<b>Tabela 4.</b> Resultados dos algoritmos PolyPhen-2 e SIFT para três SNPs associados à FLP isolada na presente amostra.....	69



## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS***

ACM: Anomalias congênitas múltiplas

*ACVR1: activin A receptor*

*ACVR2A: activin A receptor, type IIA*

*ACVR2B - activin A receptor, type IIB*

*ADH1C: alcohol dehydrogenase 1C (class I) gamma polypeptide*

*AXIN: axis inhibition protein*

*AXIN2: axis inhibition protein 2*

BBDCF: Base Brasileira de Dados Clínicos e Familiares de Fendas Orofaciais Típicas

*BCL3: B-cell CLL/lymphoma 3*

*BMP: Bone morphogenetic protein*

*BMP2: bone morphogenetic protein 2*

*BMP3: bone morphogenetic protein 3*

*BMP4: bone morphogenetic protein 4*

*BMP5: bone morphogenetic protein 5*

*BMP6: bone morphogenetic protein 6*

*BMP7: bone morphogenetic protein 7*

*BMP8: bone morphogenetic protein 8*

*BMPRIA: bone morphogenetic protein receptor, type IA*

*BMPRIB: bone morphogenetic protein receptor, type IB*

*BMPR2: bone morphogenetic protein receptor, type II,*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

C1: Concentração inicial

C2: Concentração final

CCD: *Charge-coupled Device*

*CLPTM1: cleft lip and palate associated transmembrane protein 1*

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

*CNV: copy number variation*

COGENE: *Craniofacial and Oral Gene Expression Network Database*

*DLX: Drosophila distal-less homeobox*

*Dvl1: dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)*

*DVL2: dishevelled segment polarity protein 2*

*Dvl2: dishevelled 2, dsh homolog (Drosophila)*

*Dvl3: dishevelled 3, dsh homolog (Drosophila)*

DNA: ácido desoxirribonucleico

DVL: Disheveled

DZ: dizigóticos

*ERBB2: receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, precursor*

EDTA: etilenediaminotetracetato dissódico 2H<sub>2</sub>O

*EYA1: EYA transcriptional coactivator and phosphatase 1*

FDR: *False Discovery Rate*

FGF: *fibroblast growth factor*

*FGF8: fibroblast growth factor 8*

*FGF22: fibroblast growth factor 22*

*FGF10: fibroblast growth factor 10*

*FGFR1: fibroblast growth factor receptor 1*

*FGFR2: fibroblast growth factor receptor 2*

*FGFR3: fibroblast growth factor receptor 3*

FL: Fendas labiais

FLP: Fenda labiopalatal

FOA: Fendas orofaciais atípicas

FOT: Fendas orofaciais típicas

*FOXE1: forkhead box E1*

FP: Fendas palatais

Fst: *Fixation index*

*GDF5: growth differentiation factor 5*

*GDF6: growth differentiation factor 6*

*GDF7: growth differentiation factor 7*

*GDF10: growth differentiation factor 10*

*GLI2: GLI family zinc finger 2*

*GLI3: GLI family zinc finger 3*

*GREM1 gremlin 1, DAN family BMP antagonist*

*GSK3β: glycogen synthase kinase 3 beta*

*GSTT1: glutathione S-transferase theta 1*

GWAS: *Genome Wide Association Studies*

*HOXA-1: homeobox A1*

*HOXA-2: homeobox A2*

*HOXB-1: homeobox B1*

*HOXB-3: homeobox B3*

*HOXB-4: homeobox B4*

IPDTC: International Perinatal Database of Typical Oral Clefts

INDELS: *Small insertions and deletions*

IRF: *interferon regulatory factor*

*IRF1: interferon regulatory factor 1*

*IRF2: interferon regulatory factor 2*

*IRF3: interferon regulatory factor 3*

*IRF4: interferon regulatory factor 4*

*IRF5: interferon regulatory factor 5*

*IRF6: interferon regulatory factor 6*

*IRF7: interferon regulatory factor 7*

*IRF8: interferon regulatory factor 8*

*IRF9: interferon regulatory*

*JAG2: jagged 2*

*KAL2: Kallmann Syndrome 2*

*KIF7: kinesin family member 7*

*Lefty: left-right determination factor*

*LHX: LIM homeobox*

*LHX8: LIM homeobox 8*

*LRP6: low density lipoprotein receptor-related protein 6*

*MAF: minor allele frequency*

*MGB: minor groove binder*

*MSX: muscle segment homeobox*

*MSX1: msh homeobox 1*

*MSX2: msh homeobox 2*

*MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)*

MZ: monozigóticos

NCBI: National Center for Biotechnology Information

*Nodal: nodal growth differentiation factor*

NSCLP: *Nonsyndromic cleft lip and palate*

OR: *odds ratio*

*OTX: homeobox orthodentical*

PAX: *Paired box*

*PAX9: paired box gene 9*

PMx: processos maxilares

PNL: Processos nasais laterais

PNM: Processos nasais mediais

PP: processos palatais

PPS: síndrome pterígio poplíteo

PCFB: Projeto Crânio-face Brasil

PCR: reação em cadeia da polimerase

Pdf: *portable document format*

*PTCH1: patched 1*

*PTCH2: patched 2*

*PVRL1: poliovirus receptor-related 1*

*PVRL2: poliovirus receptor-related 2*

*QNQ: um quencher não fluorescente*

*RARA: retinoic acid receptor, alpha*

*ROI: regiões óticas de interesse*

*SATB2: SATB homeobox 2*

*SHH: sonic hedgehog*

*SMO: smoothed, frizzled class receptor*

*SNP: Single-Nucleotide Polymorphism*

*SOX7: SRY (sex determining region Y)-box 7*

*SUMO-1: small ubiquitin-like modifier 1*

*Spf: SNP Plate File*

*Tm: temperatura de fusão*

*TBX1: T-box 1*

*TBX10: T-box 10*

*TBX22: T-box 22*

*TCEB3: transcription elongation factor B3*

*TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido*

*TFAP2A: transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)*

*TGF $\beta$ : transforming growth factor beta*

*TGF- $\beta$ 3: transforming growth factor, beta 3*

*TGFBR1 - transforming growth factor, beta receptor 1*

*TGF $\beta$ R2 - transforming growth factor, beta receptor II*

*TP63: tumor protein p63*

*TRPS1: trichorhinophalangeal syndrome I*

txt: *text file*

UTR: untranslated region

V1: volume inicial

V2: volume final

VWS: *síndrome de Van der Woude*

WHS: *síndrome de Wolf-Hirschhorn*

WNT: *wingless-type MMTV integration site Family*

*WNT3: wingless-type MMTV integration site family, member 3*

*WNT3A: wingless-type MMTV integration site family, member 3A*

*WNT5A: wingless-type MMTV integration site family, member 5A*

*WNT7A: wingless-type MMTV integration site family, member 7A*

*WNT9A: wingless-type MMTV integration site family, member 9A*

*WNT11: wingless-type MMTV integration site family, member 11*

UV: ultravioleta



## **APRESENTAÇÃO**

As fendas orofaciais típicas compõem um grupo de defeitos congênitos comuns e multifatoriais. Entretanto, como sua etiologia envolve diversos fatores os mecanismos gene-gene, gene-ambiente permanecem desconhecidos. Por isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou o projeto *Global Strategies to Reduce the Health-Care Burden of Craniofacial Anomalies*, que tinha como objetivos determinar prioridades, consensos globais e protocolos comuns de pesquisa.

O Projeto Crânio-face Brasil (PCFB) foi iniciado em 2003 no Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Trata-se de uma proposta multicêntrica e multiprofissional, cujo objetivo principal é trazer subsídios científicos para a melhoria na atenção à saúde de pessoas com anomalias craniofaciais.

Minha participação neste projeto começou em 2009, com meu trabalho de mestrado, intitulado “Investigação dos genes *BMP4* e *TFAP2A* em pacientes com fendas orofaciais típicas”. Fui a primeira aluna a trabalhar com fendas labiopalatais isoladas utilizando casos coletados da Base Brasileira de Fendas Orais do PCFB, que foi implantada em 2008. Isto foi muito desafiador não só pelo aprendizado das técnicas envolvidas, mas porque, nesta época, ainda estava em desenvolvimento toda a logística de registro de casos e envio de amostras para investigação nos Laboratórios de Citogenética e Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Defendi minha dissertação em 2011 e, ao discutir as possibilidades para realização de meu projeto de Doutorado, sabia que gostaria de continuar na área de genética craniofacial.

Nesta época, a técnica de *Openarray* estava no início e pude implantá-la para este grupo de pesquisa. Além das dificuldades iniciais de uma nova técnica, a definição prévia do tamanho amostral se revelou um aspecto mais complexo ainda: definimos pela adoção de diretrizes para classificação de defeitos congênitos isolados que exigiam investigação com exames complementares (ultrassonografia, ecocardiografia e tomografia em algumas situações). Com muitos bebês registrados e em seguimento pelo PCFB, não era possível a conclusão imediata do diagnóstico, o que levou a muita ansiedade até completarmos a amostra. Participei ativamente de todo o processo, desde o contato com os médicos, registro laboratorial, formação do biorrepositório de amostras de pacientes e de controles, atividades de bancada e discussões científicas.

Todo este período junto a este grupo de pesquisa foi realmente formador de meu aprendizado científico e estou muito satisfeita por ter participado e contribuído para o crescimento do PCFB.

# *INTRODUÇÃO*

## **1. Classificações e epidemiologia**

As fendas orofaciais compõem um grupo heterogêneo de defeitos congênitos e podem ser divididas em dois grandes grupos: as fendas orofaciais típicas (FOT) e as fendas orofaciais atípicas (FOA). As FOA são raras e compreendem as fendas faciais transversais, as fendas faciais oblíquas e as fendas de lábio inferior, entre outras classificadas por Tessier em 1976 (1,2).

Dentre as anomalias craniofaciais mais frequentes e estudadas atualmente estão as FOT. As FOT, também chamadas de fendas orais, são comuns e, de modo geral, são classificadas em três categorias: aquelas que afetam apenas o lábio (fendas labiais, FL), aquelas que afetam o lábio e o palato (fendas labiopalatais, FLPs) e aquelas que afetam o palato isoladamente (fendas palatais, FP) (3).

De forma geral, as FL e FLP têm sido consideradas variantes do mesmo defeito, uma vez que compartilham alterações no palato primário, diferindo apenas na gravidade (3). Entretanto, dados epidemiológicos e biológicos sugerem que as FL e FLP podem apresentar etiologias genéticas distintas (4,5,6), mesmo que vias comuns sejam a base da etiologia de cada grupo, já que ocasionalmente, tanto casos de FL quanto de FLP compartilham a mesma ascendência. Dados recentes sugerem que estas duas categorias devem, sempre que possível, ser analisadas separadamente (5).

A prevalência das FOT é variável segundo a composição étnica e a origem geográfica da população afetando, mais comumente, indivíduos de descendência asiática ou

ameríndia (1/500 nascimentos) (7). As populações caucasianas possuem taxa de prevalência intermediária, aproximadamente 1/1.000 nascimentos (8). Estas observações sugerem que a contribuição relativa da susceptibilidade genética individual pode variar entre diferentes populações. As possíveis explicações para as diferenças na prevalência entre diferentes etnias e status socioeconômico incluem fatores ambientais como uso de vitaminas, nutrição, acesso a cuidados médicos e estilo de vida.

A maioria das FOT ocorre como um defeito isolado, embora possa ser associada a outras anomalias ou síndromes (9). A prevalência mundial de FLP isolada é de 6,64 por 10.000 nascidos vivos (10) e a brasileira é de cerca de 19,33 por 10.000 nascidos vivos (Organização Mundial de Saúde (OMS) "Programas e projetos" <http://www.who.int/genomics/anomalies/americas/en/index.html>).

As FOT constituem um grupo de defeitos do desenvolvimento embrionário decorrente de alterações da diferenciação celular e/ou da fusão dos processos faciais e/ou palatinos (11). Estas malformações são caracterizadas por uma separação incompleta entre as fossas nasais e orais, ou seja, são derivadas de uma embriopatia com a falha da: a) fusão das proeminências nasais mediais e maxilares (FL; MIM 119530) ou b) fusão dos processos palatais (FP; MIM 119540), ou c) ambas as falhas (FLP; MIM 119530) (11).

Esse grupo de defeitos pode ocorrer como uma anomalia isolada, como parte de uma seqüência, ou dentro de um quadro de anomalias congênicas múltiplas (ACM). Nos casos de ACM, a fenda oral pode ser encontrada em síndromes monogênicas, associações, ou em quadros de ACM sem etiologia conhecida. Apesar dessa classificação feita por alguns autores, a grande maioria das publicações científicas, inclusive de estudos genéticos, divide as FOT apenas em sindrômicas e não-sindrômicas (9). Entretanto, mesmo nesses estudos não

há consenso sobre a investigação ou menção a exame físico dismorfológico, o que pode gerar dificuldade na correta interpretação dos resultados.

A precisa caracterização do fenótipo é crucial para a compreensão tanto da epidemiologia e da etiologia de qualquer malformação congênita, porque o poder para detectar efeitos é enfraquecido quando grupos heterogêneos são tratados como uma única entidade.

Embora várias síndromes mendelianas raras incluam fendas orais entre seus sinais clínicos, a maioria dos casos de FOT são não-sindrômicos e não mendelianos (12, 13). Aproximadamente 70% de todos os casos de FLP e 50% dos casos de FP são considerados não-sindrômicos ou isolados (7,12). Os demais casos são compostos por diversas síndromes de malformações, incluindo mais de 600 síndromes mendelianas ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/)) (7).

Nos últimos anos, muito esforço tem sido realizado para se delinear os distúrbios mendelianos e identificar os genes envolvidos em tais transtornos. No entanto, apenas uma pequena parcela de indivíduos com fenda oral tem uma etiologia conhecida. As FOT sindrômicas apresentam, muitas vezes, padrões de herança mendeliana e, portanto, favoráveis à identificação das causas genéticas (14).

A grande parte dos casos de FLP ocorre de forma esporádica, mas em algumas famílias há recorrência e até observa-se um padrão de herança mendeliana (12). Dessa maneira, as FLPs podem ser classificadas como esporádica ou familiar.

Apesar da patogênese da FLP ser complexa e multifatorial (12,13,15), a importância dos fatores genéticos tem sido cada vez mais reconhecida, o que pode ser comprovado pelos resultados de alta agregação familiar, por taxas de riscos de recorrência e

pela elevação nas taxas de concordância de gêmeos monozigóticos (MZ) quando comparadas aos dizigóticos (DZ) (16).

As fendas orais mostram forte agregação familiar e têm uma elevada taxa de recorrência familiar em comparação com outros defeitos congênitos. O risco de recorrência entre parentes de primeiro grau é aproximadamente 32 vezes maior do que o risco da população geral para fenda de lábio com ou sem fenda de palato, e cerca de 56 vezes maior para FP (17). Em estudos envolvendo gêmeos, a taxa de concordância é de 40% a 60% em gêmeos MZ e é significativamente maior do que a observada em gêmeos DZ, que é apenas de 3% a 5%. A alta taxa de concordância em gêmeos MZ fornece provas substanciais de um forte componente genético (18,19).

A ocorrência de FLP e FP também se altera dependendo do sexo e lateralidade da fenda. Os meninos são mais afetados por FLP do que as meninas na razão de 2:1. Por outro lado, a proporção de FP é inversa, na razão de 1:2 meninos para meninas. Além disso, as FL podem ser divididas em bilaterais ou unilaterais (20). Aproximadamente 75% das FL são unilaterais. Entre as fendas unilaterais, aquelas que afetam o lado esquerdo são duas vezes mais comuns que as fendas do lado direito (21).

Imediatamente após o nascimento, os indivíduos com FLP têm deformações faciais, problemas na alimentação, e infecções recorrentes do ouvido médio. Desse modo, o tratamento requer intervenções multidisciplinares: cirúrgicas, ortodônticas, fonoaudiológicas e psicológicas. Na idade de aquisição da fala, a terapia da fala é muitas vezes necessária para corrigir problemas resultantes de defeitos musculares da fenda oral. À medida que o indivíduo continua a crescer, defeitos no desenvolvimento dos dentes e má oclusão podem exigir tratamento dentário especializado, por vezes, cirúrgico. A longa série de tratamentos,

desde o nascimento até a idade adulta é um grande ônus para o paciente, a família e a sociedade (19). Foram feitos vários esforços para compreender a etiologia da FLP, de modo a prever a sua ocorrência e para impedi-la. Nos últimos anos, avanços na genética e biologia molecular começaram a revelar a base do desenvolvimento craniofacial, e vários genes associados com FLP foram identificados.

Diante da complexidade clínica e etiológica das FLPs, a avaliação genético-clínica dos pacientes é fundamental para obtenção de diagnósticos consistentes e acurados. No plano individual, o diagnóstico é a base para o planejamento do tratamento, a estimativa do prognóstico, a adoção de condutas antecipatórias e o aconselhamento genético. Em perspectiva populacional, permite o reconhecimento e a descrição do perfil de morbidade e de fatores de risco específicos de determinada população e que podem ser alvos de ações preventivas (22).

## **2. Desenvolvimento craniofacial**

Para entender o desenvolvimento patológico, é fundamental entender os mecanismos do desenvolvimento normal. As fendas orofaciais surgem do fracasso dos processos de desenvolvimento craniofacial normal. O adequado desenvolvimento da face requer a coordenação de uma série complexa de eventos e inclui o crescimento celular, migração, diferenciação e apoptose.

O desenvolvimento da face começa na quarta semana de desenvolvimento embrionário, quando as células da crista neural migram para formar os primórdios faciais: o processo frontonasal, o par de processos mandibulares e o par de processos maxilares (PMx).

Após a formação das proeminências faciais, os placoides nasais invaginam para formar a processos nasais laterais (PNL) e mediais (PNM) (Figura 1) (23).

Vários eventos indutivos entre o prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo e tecido da crista neural, que migram para o complexo craniofacial e arco faríngeo, ajudam a formar as cinco proeminências faciais (24, 25). Os PMx são derivados a partir do primeiro arco faríngeo e contribuem para os lados da face, lábios e do palato secundário (26). É a diferenciação, o crescimento e a eventual fusão desses processos que resultam na formação da face definitiva.

As células da crista neural desempenham um papel integral na morfogênese facial. Pouco antes da fusão das pregas neurais para formar o tubo neural, células neuroectodermicas adjacentes à placa neural migram para a região do nervo facial, onde formam o esqueleto e tecido conjuntivo da face: ossos, cartilagens e todos os tecidos, exceto o esmalte dental (27, 28). Assim o mesênquima facial é de origem da crista neural. Os endotélios vasculares e musculares, no entanto, são de origem mesodérmica.

## **2.1.Desenvolvimento do lábio e do palato**

Parte do desenvolvimento do lábio superior e nariz iniciam-se no final da 4<sup>a</sup> semana de gestação humana (11). Na 5<sup>a</sup> semana de gestação, os PNM e PNL de cada uma das placas nasais, áreas cujo mesênquima é derivado do prosencéfalo e de células da crista neural, crescem para se tornar proeminências projetando-se frontalmente, rodeando um par de sulcos nasais, que irão se desenvolver em narinas. Ao mesmo tempo, a região dorsal do primeiro arco branquial do crânio expande frontalmente abaixo da região de desenvolvimento

do olho para formar a PMx, enquanto a região ventral e mais caudal do primeiro arco torna-se o maxilar inferior (11, 29, 30).

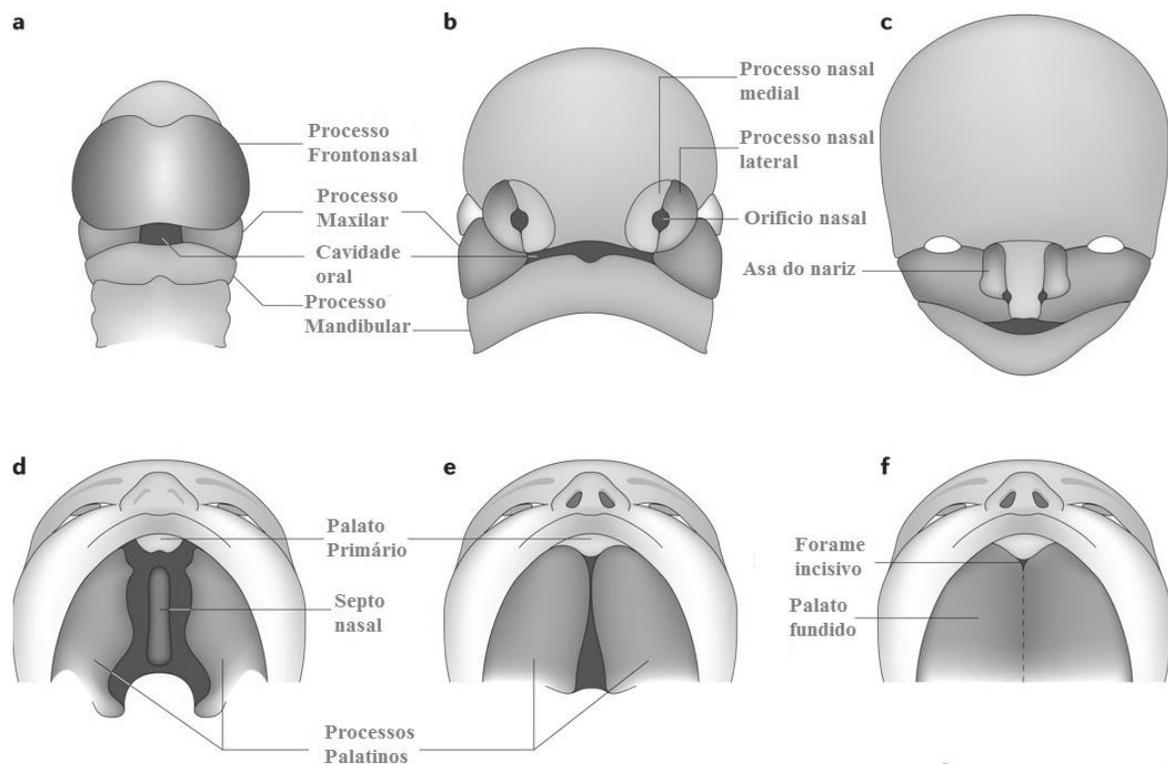
Durante a sexta e sétima semanas de gestação, as PNM e PNL sofrem um crescimento direcional para convergirem e se fundirem com as PMx. Na superfície externa as PNM e PMx parecem se encontrar, em primeiro lugar, na parte frontal dos sulcos nasais e é seguida pela reunião das PNM e PNL na área interna do sulco nasal formando o lábio (30).

O palato é formado pela união de 2 elementos: o palato primário e o palato secundário. O palato primário é definido como a parte do primórdio facial que, inicialmente, separa a cavidade oral e nasal e inclui partes do PNM, do PNL, do processo frontonasal e do PMx que contribuem para a separação das cavidades. O desenvolvimento normal do palato primário envolve diversos eventos moleculares e celulares que estão intensamente cronometrados. O palato primário inicialmente se forma em torno dos placóides olfativo em desenvolvimento com a rápida proliferação do epitélio lateral e mesênquima subjacente. (31)

O palato secundário é definido como a parte do primórdio facial posterior ao palato primário e inclui os dois processos palatais (PP) laterais que se projetam medialmente para os PMx. Os primórdios do palato secundário formam o palato duro (osso), o palato mole (o velum) e o osso alveolar e basal da maxila. Tal como acontece no desenvolvimento do palato primário, o encerramento e a fusão do palato secundário exigem uma interação complexa dos movimentos dos processos palatais, sendo a coordenação do crescimento entre os processos e a apoptose ao longo da margem medial do epitélio dos processos palatais (31) eventos criticamente cronometrados.

O palato secundário começa a se desenvolver na sétima semana de embriogênese quando os PP surgem como conseqüências do PMx. Os PP desenvolvem verticalmente,

elevam a uma posição horizontal, fazem contato e se fundem (32). Uma vez que os PP são elevados e aproximados, eles se aderem na superfície de contato, sendo a fusão na linha ao longo das bordas mediais e a apoptose do epitélio mecanismos essenciais para o desenvolvimento normal do palato secundário. Fusão bem sucedida do palato secundário resulta em separação completa das cavidades nasal e oral (Figura 1).



**Figura 1:** Diagramas esquemáticos do desenvolvimento do lábio e palato em humanos. (A) Desenvolvimento da proeminência frontonasal, do par de processos maxilares, do par de processos mandibulares que rodeiam a cavidade oral na quarta semana do desenvolvimento embrionário. (B) Na quinta semana, os orifícios nasais se formam, o que leva à formação do

par de processos nasal lateral e medial. (C) Os processos nasais mediais se fundiram com os processos maxilares para formar o lábio superior e palato primário até o final da sexta semana. Os processos nasais laterais formam a asa do nariz. Da mesma forma, os processos mandibulares se fundem para formar o maxilar inferior. (D) Durante a sexta semana de embriogênese, o palato secundário se desenvolve como consequência bilateral dos processos maxilares, que crescem verticalmente para baixo do lado da língua. (E) Posteriormente, os processos palatais elevam a uma posição horizontal acima da língua, entram em contato um com o outro e começam a se fundir. (F) Fusão dos processos palatais, em última análise divide o espaço oronasal em duas cavidades, oral e nasal (7).

## **2.2.Base embriológica da fenda labial e palatal**

O momento exato do posicionamento das proeminências faciais durante o desenvolvimento embrionário é crucial. Qualquer alteração poderá resultar na formação de FLP. Fatores genéticos e ambientais que inibem o fluxo de células da crista neural ou diminuem o seu número podem afetar as massas celulares, tornando inadequado ou impossível o contato entre as proeminências faciais. O epitélio que cobre o mesênquima pode não sofrer morte celular programada, impedindo a fusão dos placóides. Portanto, qualquer mudança na posição do placóide nasal ou crescimento direcional anormal das proeminências faciais pode resultar em fenda orofacial.

Assim, a FL resulta da falha da fusão da PNM e da PNL com a PMX, resultando em uma lacuna, lateral a linha mediana, estendendo-se até o lábio superior e maxilar na narina (20, 30, 31).

As FP podem surgir devido a defeitos primários na palatogênese ou podem ser secundárias aos distúrbios em outras estruturas craniofaciais. Os defeitos primários incluem o crescimento deficiente dos PP, falha da elevação dos PP, falha da migração e fusão dos PP e ruptura de pós-fusão nos PP (33, 34).

Os defeitos secundários podem ser distúrbios de crescimento ou da morfologia de estruturas craniofaciais, incluindo a base craniana, e (ou) obstrução mecânica da elevação dos PP pelo tamanho ou posicionamento anormal da língua (34, 35). Em alguns casos a micrognatia é um fator que pode inibir a elevação dos PP, como pode ocorrer, por exemplo, na síndrome de Pierre Robin.

Além disso, a FP resulta em uma comunicação com a cavidade nasal e é um defeito de linha média relevante. Algumas estruturas adicionais que podem ser afetadas por FP são: a dentição, o osso alveolar e basal do palato primário e a musculatura labial. Os indivíduos com fenda de palato primário podem apresentar deslocamento dental, agenesia dentária ou hipoplasia do pré-maxilar (20, 29, 31).

O movimento e o destino dos tecidos da crista neural para o primórdio facial são controlados em parte por várias famílias de genes, compreendendo genes regulatórios *homeobox* (*HOXA-1- homeobox A1*, *HOXA-2- homeobox A2*, *HOXB-1- homeobox B1*, *HOXB-3- homeobox B3*, e *HOXB-4- homeobox B4*), genes *OTX* (*homeobox orthodentical*), genes *DLX* (*Drosophila distal-less homeobox*), genes *MSX* (*muscle segment homeobox*) e genes *LHX* (*LIM homeobox*) (31).

A rápida elevação dos PP resulta de uma série de mecanismos que podem estar relacionados com a expressão dos genes *FGF8* (*fibroblast growth factor 8*) e *SHH* (*sonic hedgehog*) ao longo da borda medial do PMx (31). É também observada expressão

aumentada de moléculas de adesão celular como *TGF-β3* (*transforming growth factor, beta 3*) e *caderina-N* ao longo da margem medial dos PP, sendo que os mesmos podem causar apoptose e diferenciação epitelial (31).

### **3. Etiologia**

A etiologia das FLPs isoladas é multifatorial, sendo determinada por fatores ambientais e genéticos (12, 36, 37, 38), porém os exatos fatores de risco associados com FLP permanecem desconhecidos (7, 39).

As alterações em mais de um gene têm sido apontadas como necessárias para a ocorrência de fendas orais, já que a formação dos lábios e do palato envolve vários processos celulares (proliferação, diferenciação e adesão celular; e apoptose) com risco de falha. Conseqüentemente, várias interações podem ocorrer entre genes que regulam esses processos (12, 14, 38).

#### **3.1.Fatores predominantemente ambientais**

Dados epidemiológicos respaldam um papel para os fatores de risco ambientais no desenvolvimento de fendas orais. A contribuição dos fatores ambientais na etiologia das FOT é sugerida por diversos estudos. Alguns teratógenos humanos estão associados à FLP, entre eles: álcool etílico e tabaco (12, 15, 34, 40).

O uso de álcool materno, além de causar a síndrome do alcoolismo fetal, também aumenta o risco de FLP. Munger et al. (41) mostrou que o consumo materno aumentou o

risco de FLP de 1,5 a 4,7 vezes de uma forma dose-dependente. Os resultados foram apoiados por Shaw e Lammer (42), que mostraram que as mães que consumiam mais de cinco doses por dia tiveram 3,4 vezes mais risco de ter um bebê com FLP. O consumo de nível baixo de álcool, no entanto, não parece aumentar o risco de fendas orais. (43).

Enquanto o álcool é um teratígeno estabelecido (44), o uso de álcool materno relacionado a fendas orais tem sido inconsistente (45). Algumas evidências que fundamentam a relação entre o consumo de álcool materno e fendas orais vêm de uma associação entre fendas orais e variantes genéticas no gene álcool desidrogenase *ADH1C* (*alcohol dehydrogenase 1C (class I) gamma polypeptide*) (46). Além disso, um estudo recente demonstrou que a combinação de variantes *ADH1C* com reduzida atividade enzimática e uso intenso de álcool materno aumentou o risco de fendas orais (47). A influência do álcool também pode ser combinada com outros fatores de risco, tais como nutrição, tabagismo e estresse.

O tabagismo materno tem sido consistentemente associado com um risco aumentado de FOT, com um risco atribuível à população estimada de até 20% e um *odds ratio* (OR) de 1.3 para FLP (48). Quando o tabagismo materno foi considerado junto com uma história genética positiva, o efeito combinado foi mais significativo. Além disso, van Rooij et al. (49) descobriram que o genótipo materno *glutathione S-transferase theta 1* (*GSTT1*), quando combinado com o fumo, pode aumentar significativamente o risco de FLP (OR = 4,9). Beaty et al. (50) relataram que o tabagismo materno e genótipos *MSX1* (*msh homeobox 1*) em fetos agiram em conjunto para aumentar o risco de FLP em 7,16 vezes. O genótipo materno *MTHFR* [*methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)*] parece afetar

o risco de FOT, mas os estudos não são consistentes (51, 52, 53). Observa-se, portanto, a existência de interação de fatores genéticos com ambientais na gênese de FLP, de modo geral.

O estado nutricional de mulheres grávidas também tem recebido bastante atenção com respeito à incidência de fendas orais. Durante a gestação, a baixa ingestão de vitaminas do complexo B concomitante com a exposição excessiva ou deficiente à vitamina A foram associadas a um risco aumentado de fendas orais (15).

A nutrição durante a gravidez tem sido sugerida como um outro fator de contribuição com base em estudos observacionais e de intervenção, utilizando suplementos de ácido fólico como medida preventiva (54). O efeito benéfico da utilização do folato, no entanto, permanece controverso e não tem sido consistentemente replicado (54, 55). Outros nutrientes, incluindo o colesterol (56), o zinco (57) e o uso de multivitaminas em geral (58) também têm sido estudados, mas é preciso ser expandido para populações maiores.

Finalmente, outras exposições a teratógenos e toxinas ambientais também têm sido associadas ao aumento do risco de fendas orais (59), tal como ácido retinóico, ácido valpróico, trimetadiona, talidomida e drogas anticonvulsivantes, como a fenitoína, (12, 15, 34, 39, 40, 60).

### **3.2.Fatores predominantemente genéticos**

As causas genéticas das FLPs incluem rearranjos cromossômicos, susceptibilidade genética a teratógenos e mutações patogênicas em múltiplos genes (61). Existem aproximadamente 600 síndromes genéticas já descritas associadas à FLP, sendo que mais da metade têm um padrão de herança monogênica (62, 63).

As alterações cromossômicas são mais frequentemente encontradas em pacientes com fendas orais associadas a síndromes multissistêmicas complexas. Dentre estas, destacam-se as trissomias do 13 (Síndrome de Patau) e do 18 (Síndrome de Edwards), deleção 4p (Síndrome de Wolf-Hirschhorn, VWS), deleção 18q (Síndrome de deleção 18q) e microdeleção 22q11 (Síndrome Velocardiofacial ou Síndrome de DiGeorge).

A variação genética em mais de um gene tem sido apontada como necessária para a ocorrência de fendas orais, já que a formação dos lábios e do palato envolve vários processos celulares e que a falha em qualquer um desses pode ocasionar a fenda oral. Conseqüentemente, variações e interações podem ocorrer entre genes que regulam esses processos (38).

A diversidade de eventos embriológicos que contribuem para a formação das estruturas faciais se reflete no grande número de genes conhecido ou suspeito de estar envolvido na etiologia das FOT (19).

A seguir, apresenta-se um breve resumo de alguns dos principais genes candidatos para fendas orais e suas respectivas funções em vias genéticas conhecidas por moldar o complexo craniofacial.

### **3.2.1. Genes candidatos e vias envolvidas na etiologia de FLP**

#### **3.2.1.1. Fatores de sinalização extracelular**

O destino das células é regulado por moléculas de sinalização. Estas são substâncias químicas (hormônios, neurotransmissores, entre outros) sintetizadas e segregadas por células com a finalidade de comunicação extracelular. Após a ligação aos seus respectivos receptores de superfície celular, estas moléculas sinalizadoras iniciam uma cadeia de eventos moleculares e ativam fatores de transcrição específicos (proteínas que se ligam diretamente ao DNA - ácido desoxirribonucleico). Esses fatores de transcrição ligam-se a regiões reguladoras do genoma e ativam a expressão ou a repressão de conjuntos específicos de genes que controlam o comportamento das células. O processo acima é um evento crucial e repetido no desenvolvimento do embrião e a base para a formação correta de todas as estruturas embrionárias, incluindo o crânio (64). Estudos sobre desenvolvimento orofacial têm identificado várias moléculas de sinalização (principalmente fatores de crescimento) e fatores de transcrição.

Os fatores de crescimento são moléculas de peptídeo ou hormônios esteroides que estimulam o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular. Os eventos moleculares que estão na base da formação de estruturas orofaciais estão sob o estrito controle de uma variedade de genes que pertencem principalmente a quatro famílias de fatores de crescimento que são bem conservadas entre diferentes espécies: FGF (*fibroblast growth factor*), SHH, WNT (*wingless-type MMTV integration site family*) e TGF $\beta$

(*transforming growth factor beta*), que inclui as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP - *Bone morphogenetic protein*) e ativinas (65).

#### **3.2.1.1.1. Superfamília TGF $\beta$**

A superfamília de fatores de crescimento TGF $\beta$  regulam muitos aspectos do desenvolvimento do esqueleto, incluindo formação da cartilagem e óssea, modelação da mesoderme, e desenvolvimento craniofacial e de membros (66). Este grupo de fatores de crescimento e de diferenciação incluem TGF- $\beta$ , proteínas morfogênicas ósseas (BMP), e moléculas sinalizadoras ativinas (67).

A inativação do receptor do gene *TGF $\beta$ 3* (*TGF $\beta$ R2 - transforming growth factor, beta receptor II*) em células da crista neural de camundongo resultou em FP e anomalias na formação do crânio (68, 69), implicando, assim, a via de sinalização TGF $\beta$  na cascata molecular que determina o desenvolvimento craniofacial. A inativação de outro receptor do gene *TGF $\beta$*  (*TGFBR1 - transforming growth factor, beta receptor I*) em camundongos provoca fendas unilaterais ou bilaterais no lábio superior (70), indicando que a via TGF $\beta$  pode ser também importante na formação do lábio.

Embora os outros membros da família TGF $\beta$  sejam temporal e espacialmente expressos no desenvolvimento do palato, apenas o *knockout Tgfb3* inibe a fusão dos PP em camundongos (71,72,73). Em humanos, foi observada uma ligação significativa entre a região do gene *TGFB3* e fenda de lábio com ou sem fenda de palato isolada (74), apesar de uma falta de associação com este gene em estudos anteriores (75).

Como outros membros da superfamília TGF- $\beta$ , as BMP exercem os seus efeitos ligando-se a dois tipos de receptor serina/treonina kinases (tipo I e II) ligadas à membrana (76). Existem três receptores tipo I (*ACVR1* - *activin A receptor*, *BMPRIA* - *bone morphogenetic protein receptor, type IA* e *BMPR1B* - *bone morphogenetic protein receptor, type IB*) e três receptores tipo II (*BMPR2* - *bone morphogenetic protein receptor, type II*, *ACVR2A* - *activin A receptor, type IIA* e *ACVR2B* - *activin A receptor, type IIB*) conhecidos por mediar sinais de BMP (52). Após a ligação de uma proteína BMP ao ligando, o receptor de tipo II fosforila o receptor de tipo I. Por sua vez, o receptor tipo I fosforila e ativa um grupo de co-ativadores transcricionais denominados *Smads*, seguido por translocação do complexo para dentro do núcleo e da ativação da transcrição de genes-alvo específicos (76,77), incluindo genes *Msx* (50).

Mais de 20 membros foram identificados na família BMP (49). São classificados em cinco subfamílias com base em estudos filogenéticos e semelhança de sequências: (1) subfamília *dpp* é composta de *BMP2* (*bone morphogenetic protein 2*) e *BMP4* (*bone morphogenetic protein 4*) devido à sua semelhança com o gene *Drosophila dpp*; (2) subfamília 60<sup>a</sup> que inclui *BMP5* (*bone morphogenetic protein 5*), *BMP6* (*bone morphogenetic protein 6*), *BMP7* (*bone morphogenetic protein 7*) e *BMP8* (*bone morphogenetic protein 8*); (3) *BMP3* (*bone morphogenetic protein 3*) e *GDF10* (*growth differentiation factor 10*) em conjunto constituem uma subfamília única; (4) *GDF5* (*growth differentiation factor 5*), *GDF6* (*growth differentiation factor 6*), *GDF7* (*growth differentiation factor 7*) constituem outro subgrupo nesta família, e (5) *Nodal* (*nodal growth differentiation factor*) e *Lefty* (*left-right determination factor*) são membros distantes da subfamília BMP (78, 79).

Os genes *BMP2* e *BMP4* são expressos em determinados momentos e em regiões específicas do epitélio nasal, do maxilar e dos processos mandibulares (80). Em experiências em que *Noggin*, uma molécula que antagoniza a ação de moléculas de BMP, foi aplicado sobre os processos faciais de embriões em desenvolvimento, a forma e o tamanho dos processos faciais foram alterados de forma significativa (81). Além disso, a superexpressão ou inibição da sinalização de BMP em embriões causa FL (82).

O gene *Bmp4* parece ser particularmente importante na fusão do lábio e do palato. Em modelo de camundongo condicional *knockout Bmp4*, todos os embriões apresentavam fenda de lábio bilateral no 12º dia pós concepção, mas por volta de 14,5 dias pós concepção, apenas 22% ainda exibiram fenda de lábio (83,84). Assim, várias fendas iniciais pareciam ter sido curadas no útero, possivelmente através de complementação ou regulação de outros genes *Bmp* (30).

#### **3.2.1.1.2. Fatores de crescimento de fibroblastos**

A via de sinalização do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) é altamente conservada evolutivamente e desempenha funções importantes em vários aspectos do desenvolvimento craniofacial, incluindo indução da crista neural, esqueletogênese e interações epitélio-mesenquimal (78). Múltiplos membros da família FGF são expressos em domínios que se sobrepõem durante o desenvolvimento nasal e região média da face (85).

A via de sinalização FGF está ativa tanto no epitélio quanto no mesênquima facial e está envolvida, principalmente, na estimulação da proliferação celular. As mutações nas

moléculas FGF ou em seus receptores podem resultar em craniossinostoses (86,87), o que reflete o papel da sinalização do FGF nos processos de osteogênese e condrogênese.

Provas convincentes ligando fenda orofacial com os membros da família FGF e seus receptores têm sido obtidas a partir de estudos em animais transgênicos. Os camundongos que carregavam uma deleção no gene que codifica tanto *fgf10* (*fibroblast growth factor 10*) como *fgfr2* (*fibroblast growth factor receptor 2*) possuíam um fenótipo de FP (88). O gene *Fgf8*, por exemplo, é expresso no desenvolvimento do ectoderma e do endoderma do arco faríngeo durante a migração de células da crista neural através dos arcos da faringe (89).

Durante a formação do palato, as moléculas de FGF e seus receptores são expressas nos PP em desenvolvimento (90). Nos seres humanos, as mutações nos genes *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor 1*), *FGFR2*, e *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*) são associadas com craniossinostose e outras malformações face-esqueléticas (91). Um bom exemplo é a síndrome de Apert, causada por mutações no gene *FGFR2*, na qual em torno de 75% dos pacientes apresentam FP ou úvula bífida (92). Por outro lado, mutações com perda de função do gene *FGFR1* são encontradas em KAL2 (*Kallmann Syndrome 2*), uma forma autossômica dominante da síndrome de Kallmann associada com hipogonadismo, anosmia e fenda oral em cerca de 5% a 10% dos pacientes (93,94). Tal como acontece com a síndrome de Van der Woude (VWS), alguns indivíduos com KAL2 podem apresentar fendas como o único componente do fenótipo, o que reforça a necessidade de avaliações fenotípicas criteriosas e de mapeamentos genéticos (95).

O seqüenciamento de 12 genes *FGF* em 184 indivíduos com FLP isolada identificou sete potenciais mutações causadoras de doenças, incluindo uma mutação sem

sentido no gene *FGFR1*, mutação de novo de sentido trocado no gene *FGF8*, e outras variantes de sentido trocado nos genes *FGFR1*, *FGFR2* e *FGFR3*. Curiosamente, a mutação sem sentido foi identificada em um paciente com síndrome de Kallmann e seu pai com apenas FLP isolada, destacando questões de não penetrância na identificação de mutações em fenda de lábio com ou sem fenda de palato isolada (96).

### 3.2.1.1.3. *SHH*

O gene *Sonic Hedgehog* (SHH) é o principal membro da família *Hedgehog* que está associado com eventos fundamentais de desenvolvimento durante a embriogênese orofacial (97). A sinalização Shh é essencial para a normal padronização e o crescimento da face. A análise de interações entre os genes *Shh* e *Fox* indicam que os genes *Fox* pelo menos medeiam parcialmente a ação de genes *Shh* no desenvolvimento facial (98). Nos seres humanos, a perda de um alelo *SHH* é suficiente para causar holoprosencefalia (desenvolvimento anormal do prosencéfalo e face) (99,100).

A sinalização celular é iniciada através da ligação de Shh ao seu receptor de superfície celular *patched homolog 1* (Ptch1) para ajudar na repressão basal de *Smoothened* (Smo) (101). Smo então ativa a família GLI de fatores de transcrição *zinc-finger* para a transdução do sinal Shh para o núcleo.

O *PTCH* é um gene supressor de tumores localizado em 9q22.3, na vizinhança de uma região altamente provável de possuir um gene candidato forte para fendas orofaciais (74). Mutações em vários membros da via SHH (por exemplo, *PTCH1* - *patched 1*, *PTCH2* - *patched 2*, *GLI2* - *GLI family zinc finger 2*, *GLI3* - *GLI family zinc finger 3*, *SMO* -

*smoothened, frizzled class receptor*) podem levar a diferentes defeitos congênitos, incluindo holoprocencefalia, síndrome de Gorlin, síndrome de Pallister-Hall, síndrome Rubinstein-Taybi e câncer (97). A Síndrome de Gorlin, por exemplo, é causada por mutações no gene *PTCH* e está associada com FP em 5% dos casos (102). Devido a esta associação com fendas orais, o gene *PTCH* foi examinado quanto a mutações em casos isolados de fenda de lábio com ou sem fenda de palato. Sendo que sete novas variantes normais, distribuídas ao longo de todo o gene, e três mutações missense foram encontrados entre os casos de fenda de lábio e/ou palato. (103).

A rede de sinalização do Fgf-Shh pode também desempenhar um papel importante na coordenação de interações epitélio-mesênquimal durante os estágios iniciais de desenvolvimento do palato (88,104). O sistema de sinalização Fgfr2b/FGF10 foi demonstrado ser crítico para o desenvolvimento normal do palato secundário (88). É importante ressaltar que a eliminação do receptor ou do ligando resulta em perda de expressão de Shh, indicando que a sinalização Fgf e Shh são componentes da mesma via de palatogênese.

#### **3.2.1.1.4. WNT**

Em seres humanos, a família WNT de moléculas de sinalização é composta por 19 membros. As moléculas de WNT atuam através de receptores específicos (*Frizzled 1-10*) para ativar os sinais intracelulares que ditam uma variedade de ações celulares (64).

A via de sinalização WNT consiste em uma grande família de moléculas secretoras que desempenham funções importantes em uma variedade de processos do

desenvolvimento (105). A transdução de sinal é iniciada quando as proteínas WNT se ligam a receptores de superfície celular *Frizzled*, resultando na ativação da proteína citoplasmática *Dishevelled* (106).

Durante o desenvolvimento craniofacial inicial no embrião de camundongos, os membros da família WNT são expressos em locais de iniciação dos dentes no epitélio oral, no mesênquima da elevação dos PP, e em locais de futura formação óssea da maxila e da mandíbula (107).

A perda da função de WNT em vertebrados provoca uma grande variedade de defeitos de desenvolvimento. Em humanos, uma mutação no gene *WNT3* (*wingless-type MMTV integration site family, member 3*) tem sido associada a uma condição rara chamada tetra-amelia (108). Indivíduos com tetra-amelia não têm os quatro membros e muitas vezes têm fenda de lábio com ou sem fenda de palato. Algumas mutações no gene *WNT7A* (*wingless-type MMTV integration site family, member 7A*) têm sido associadas com síndrome de Fuhrmann que também envolve anomalias de membros e FLP (109).

Muitos dos componentes de sinalização Wnt são partilhados por outras vias de sinalização. A expressão do WNT é frequentemente coincidente com a expressão de moléculas das famílias *Hedgehog* e TGF (107). A inativação da sinalização WNT em camundongos provoca fenda de lábio com ou sem fenda de palato (110).

#### **3.2.1.1.5. Fatores de transcrição**

Os genes do tipo fator de transcrição têm grande atuação no desenvolvimento embrionário precoce. Estes genes atuam no controle da transcrição de outros genes codificadores de proteínas estruturais, reguladoras ou enzimáticas (111).

### 3.2.1.1.5.1. *IRF6*

O gene *IRF6* (*interferon regulatory factor 6*) pertence a uma família de nove fatores de transcrição (112) e é fortemente expresso no ectoderma da borda dos PP antes e durante a formação do palato secundário (113,114,115). Os membros da família *IRF* (*interferon regulatory factor*) são conhecidos por regular uma variedade de mecanismos de defesa. Os camundongos deficientes de genes *irf1* (*interferon regulatory factor 1*), *irf2* (*interferon regulatory factor 2*), *irf3* (*interferon regulatory factor 3*), *irf4* (*interferon regulatory factor 4*), *irf5* (*interferon regulatory factor 5*), *irf7* (*interferon regulatory factor 7*), *irf8* (*interferon regulatory factor 8*) ou *irf9* (*interferon regulatory factor 9*) têm uma resposta imunitária comprometida (116). Estes camundongos, no entanto, não manifestam quaisquer anormalidades embriológicas. Em contraste, camundongos *irf6* nulos têm pele, desenvolvimento craniofacial e membros anormais (112), consistente com a distribuição fenotípica em pacientes com VWS e síndrome pterígio poplíteo (PPS).

Do grande número de genes candidatos que se acredita contribuir na etiologia de fenda oral, o gene *IRF6* está entre os poucos que tem mostrado um grau convincente de consistência entre os estudos (5,117). As mutações neste gene são conhecidas por causar dois distúrbios autossômicos dominantes: VWS e PPS (112,118). A VWS é um dos melhores modelos para fenda de lábio com ou sem fenda de palato isolado, em que em torno de 15% dos indivíduos afetados são clinicamente indistinguíveis de fendas orais isoladas. Estas observações rapidamente levaram à hipótese de que variantes genéticas no gene *IRF6* também podem estar envolvidas na etiologia das fendas orais isoladas, o que foi posteriormente confirmada em um grande conjunto de dados de cerca de 2000 famílias

composta por 10 populações de ascendências diferentes (119) e replicada de forma independente em vários estudos (117).

As mutações no domínio de ativação da transcrição do gene *IRF6* foram demonstradas como inibidoras da ativação da transcrição (120). Um avanço na compreensão de como o gene *IRF6* afeta o risco de fenda de lábio com ou sem fenda de palato isolada foi a recente identificação de um SNP (rs642961) que interrompeu o sítio de ligação para o fator de transcrição AP-2 $\alpha$  dentro de um elemento *enhancer IRF6* altamente conservado (5). A ligação entre *IRF6* e AP-2 $\alpha$  é particularmente notável, dado o fato de que os dados anteriores demonstraram um papel essencial para a AP-2 $\alpha$  no desenvolvimento craniofacial (121). Além disso, os camundongos que carregam tanto células tipo selvagem quanto AP-2 $\alpha$  nulo tem FLP e pronunciada dismorfologia mandibular e maxilar, consistente com desenvolvimento anormal das proeminências faciais (122).

Algumas mutações no gene *TFAP2A* [*transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)*], o gene que codifica AP-2 $\alpha$ , causam síndrome brânquio-óculo-facial, caracterizada por algumas das mesmas características observadas em VWS (fendas orais) (123). Por último, o gene *TFAP2A* está localizado no cromossomo 6p24 onde anomalias cromossômicas têm sido associadas à fenda orais (63). Assumidos em conjunto, estes resultados colocam *IRF6* e AP-2 $\alpha$  em uma via de desenvolvimento comum em que suas alterações podem contribuir para a patogênese de fenda de lábio com ou sem fenda de palato.

### **3.2.1.1.5.2. FOXE1**

Nos seres humanos, uma mutação de perda de função no gene *FOXE1* (*forkhead box E1, thyroid transcription factor 2*) foi associada à síndrome Bamforth-Lazarus, que inclui agenesia da tireóide, defeitos do folículo piloso, atresia de coanas, e FP entre as características clínicas (124). Alguns estudos apoiam uma função para o gene *FOXE1* em FLP isolada. O sequenciamento direto de 184 pacientes com fenda de lábio com ou sem fenda de palato isolado detectou mutações de sentido trocado no gene *FOXE1* em dois pacientes não relacionados e nenhuma das mutações detectadas foram encontradas em 186 controles (125).

Além disso, uma meta-análise de 13 estudos tipo *genome-wide* observou um grande sinal de ligação no cromossomo 9q21 (74), que está próximo dos genes *FOXE1* (9q22) e *PTCH* (9q22.3). Outro estudo do tipo *genome-wide* em 820 famílias com fenda de lábio com ou sem fenda de palato mostrou que a região *FOXE1* foi mais significativamente presente em famílias em que alguns ou todos os indivíduos afetados têm fenda de lábio com ou sem fenda de palato (126).

### **3.2.1.1.5.3. Fatores de transcrição T-box**

As mutações encontradas no gene *TBX22* (*T-box 22*) foram a causa de fenda palatal ligada ao X (FPX), geralmente associada à anquiloglossia (127). Subsequentemente, mutações no gene *TBX22* também foram encontradas em casos de FP isolada (128,129). Em

camundongos, a expressão do gene *Tbx22* está localizada no desenvolvimento dos PP e na base da língua, onde a anquiloglossia é observada (130,131).

Dois membros adicionais da família T-Box, *TBX1* (*T-box 1*) e *TBX10* (*T-box 10*), têm sido implicados na patogênese de fenda de lábio com ou sem fenda de palato. Aspectos genéticos da síndrome de deleção 22q11.2 são complexos, mas mutações no gene *TBX1* foram identificadas em um pequeno número de pacientes com esta condição clínica (132,133,134). Uma proporção significativa de pacientes com síndrome de deleção 22q11.2 têm anomalias palatais, incluindo FP em 9 a 11% dos casos (135).

Além disso, a expressão ectópica do gene *tbx10* resulta em FLP em camundongos transgênicos (137) e as mutações neste gene também foram encontradas em casos de fenda de lábio com ou sem fenda de palato (125).

#### **3.2.1.1.5.4. *MSX1***

O gene *MSX1*, localizado no cromossomo 4p16, é fortemente expresso em células da crista neural (138). As proteínas MSX são conhecidas por desempenharem uma função chave nas interações dos tecidos epitélio-mesenquimal durante o desenvolvimento craniofacial (139). Em humanos, mutações sem sentido no gene *MSX1* foram responsáveis por agenesia dentária e fendas orais (140). O gene *MSX1* também é deletado em pacientes com WHS, causada por deleções na região 4p16.3 (141). Entre uma série de características clínicas, os pacientes com WHS apresentam defeitos de fechamento, tais como FLP, coloboma do olho e defeitos de septo cardíaco.

Um estudo recente mostrou que variantes raras nos genes *TGFA* (*transforming growth factor, alpha*) e *MSX1* poderiam aumentar o risco de FP em até 9,7 vezes, demonstrando a importância da interação gene-gene na etiologia de fenda oral (142). Jezewski et al. (143) identificaram uma mutação no gene *MSX1* em 3 de 242 filipinos com fenda de lábio com ou sem fenda de palato. Suzuki et al. (144) e Vieira et al. (125) identificaram uma mutação de sentido trocado no gene *MSX1* em pacientes com fenda de lábio com ou sem fenda de palato vietnamitas e filipinos. O sequenciamento completo do gene *MSX1* revelou que 2% dos pacientes com fenda de lábio com ou sem fenda de palato isolada possui mutações nesse gene (143).

#### **3.2.1.1.5.5.VAX1**

O gene *Vax1* (*ventral homeobox anterior 1*) é um regulador transcricional que contém um domínio *homeobox DNA binding*. Os marcadores em/ou próximo ao gene *VAX1* tiveram significância em estudos *genome-wide* realizados por Mangold et al. (145) e *GENEVA Cleft Consortium* (146). Esta associação foi replicada em três populações asiáticas independentes (147). O gene *Vax1* é expresso em diversas estruturas craniofaciais e camundongos deficientes de *Vax1* desenvolvem FP (147).

#### **3.2.1.1.5.6.JAG2**

O gene *JAG2* (*jagged 2*) codifica um ligando para a família de receptores transmembranares *Notch*, que estão envolvidos em um mecanismo essencial de sinalização

necessário para o desenvolvimento normal do palato (149). Em estudos de associação de base familiar, evidências do envolvimento do gene *JAG2* em fenda de lábio com ou sem fenda de palato foram obtidas a partir de análises de haplótipos utilizando ensaios globais e testes de associação de haplótipos (125,150).

Interessantemente, os dados mais significativos em ambos os estudos ocorriam quando haplótipos incluíam o polimorfismo não sinônimo, rs1057744. Recentemente, tem-se demonstrado que os genes *IRF6* e *JAG2* têm vias moleculares convergentes durante a diferenciação do epitélio oral, e esta sinalização integrada é essencial para o controle da adesão e fusão palatal (151). Jagomägi et al. (152) encontraram associação do SNP (*Single-Nucleotide Polymorphism*) rs1022431, onde o alelo A foi associado a um risco mais elevado de fenda de lábio com ou sem fenda de palato. A associação mais significativa com o fenótipo de FP entre todos os genes candidatos rastreados neste estudo foi observada para o SNP rs11624283 no gene *JAG2*. Estes resultados indicam que as variantes *JAG2* podem estar envolvidas na etiologia das fendas orais em diferentes populações.

#### **3.2.1.1.5.7. *PAX9***

O gene *PAX9* (*paired box gene 9*), localizado em 14q12-q13, codifica um fator de transcrição. Em camundongos, o gene *Pax9* é expresso no mesênquima dos PP e nos dentes. Além disso, apresentaram fenda de palato secundário, agenesia dentária e outras anormalidades (153). As mutações no gene *PAX9* em humanos são relatadas como causadoras de hipodontia de molares que são frequentemente acompanhados por fenda de lábio com ou sem fenda de palato (154).

### **3.2.1.2. Modificação de proteínas**

#### **3.2.1.2.1. SUMO**

O gene *SUMO* (*Small ubiquitin-like modifier 1*) modifica várias proteínas celulares e participa de vários processos celulares, tais como transporte nuclear, regulação da transcrição, apoptose e estabilidade da proteína (155). Além disso, as deleções envolvendo o gene *SUMO1* foram recentemente identificadas em uma pesquisa de microdeleções entre um grande número de genes candidatos para fendas orais (156).

Recentemente, foi proposto que podem existir interações sinérgicas entre a via de sinalização do FGF e SUMO, e fatores de risco ambiental causando fenda de lábio com ou sem fenda de palato (91). É importante observar que vários genes previamente associados com fendas orais também são alvos de modificação *SUMO* (por exemplo *TBX22*, *MSX1*, *SATB2* - *SATB homeobox 2*, *TP63* - *tumor protein p63*, *PAX9*, *TRPS1* - *trichorhinophalangeal syndrome I* e *EYA1* - *EYA transcriptional coactivator and phosphatase 1*) (91).

### **3.2.1.3. Outros genes e loci candidatos**

#### **3.2.1.3.1. Região 19q13.1**

A evidência de um *locus* de suscetibilidade para fenda oral na região 19q13.1 foi encontrada a partir de estudos de ligação e associação (35,157,158). Yoshiura et al (159)

relataram uma família com FLP em três gerações, sendo que todos os membros afetados tiveram uma translocação equilibrada no cromossomo 19q13. Uma variedade de genes foi estudada, incluindo *BCL3*, *PVRL2*, *CLPTM1*.

O gene *BCL3* (*B-cell CLL/lymphoma 3*) é um proto-oncogene que está envolvido na proliferação celular, diferenciação e apoptose. O *PVRL2* (*poliovirus receptor-related 2*) é uma glicoproteína transmembranar que pertence à família dos receptores do poliovírus. As mutações em uma proteína relacionada, *PVRL1* (*poliovirus receptor-related 1*), são conhecidos por causar a síndrome autossômica recessiva chamada síndrome *Margarita Island* (160), e heterozigotos para a mutação *PVRL1 W185X* tem risco aumentado para FLP isolada (161).

Por meio de clonagem e de pontos de quebra foi revelado um novo gene denominado *CLPTM1* (*cleft lip and palate associated transmembrane protein 1*). O gene *CLPTM1* codifica uma proteína transmembranar que é expressa em tecidos embrionários. Oito variantes raras de *CLPTM1* foram encontrados em 74 pacientes com FLP isolada, mas nenhuma foi significativamente associada à FLP. Os autores concluíram que o gene *CLPTM1* não era um dos principais contribuintes para FLP. Por outro lado, a mesma região do cromossomo 19q13 tem sido implicada na etiologia de FLP por meio de estudos de ligação e de desequilíbrio de transmissão (162,163) Assim, o gene *CLPTM1* ou outros genes nesta região ainda podem ser associados à FLP.

### **3.2.1.3.2. *RARA***

Chenevix-Trench et al. (164) descreveram uma significativa diferença na frequência de alelos do gene *RARA* (*retinoic acid receptor, alpha*) entre casos de fenda de lábio com ou sem fenda de palato e controles. Shaw et al. (165), mostraram que os genes da região do gene *RARA*, ou variações genéticas nesse locus estão envolvidos na formação de defeitos de fenda de lábio com ou sem fenda de palato utilizando análise de ligação. Eles também encontraram uma diferença significativa na frequência alélica de D17S579 (um marcador microssatélite perto de *RARA*) entre FLP e FL. Ao contrário, Vintiner et al. (166), e Stein et al. (162) não encontraram ligação entre *RARA* e fenda oral, assim, excluindo-se qualquer relação entre o gene *RARA* e fenda oral.

Caricini et al. (2007) com um estudo baseado em família, apoia o papel do gene *RARA* em fendas orais. Resultados semelhantes também foram obtidos por Maestri et al. (168). Kanno et al. (169) não encontraram qualquer associação entre o gene *RARA* e fenda de lábio com ou sem fenda de palato na população japonesa. Peanchitlertkajorn et al. (170) investigaram vários loci no cromossoma 17, incluindo *RARA*, em famílias chinesas e descobriram que a variação genética dentro do locus de *RARA* ou próximo dele, parece estar envolvida na patogênese das fendas orais não sindrômicas nesta população.

### **3.2.1.3.3. *ERBB2***

O gene *ERBB2* (*receptor tyrosine-protein kinase erbB-2, precursor*) é 642088 pares de bases *upstream* do gene *RARA*. Uma vez que eles são relativamente próximos um

do outro, a associação referida anteriormente entre o gene *RARA* e fendas orais realmente pode ser decorrente de variações no gene *ERBB2*. O gene *ERBB2* é essencial no complexo receptor-neuregulina mas não é ativado pelo EGF (fator de crescimento ectodérmica) ou *TGFA* (fator de crescimento transformante alfa) (171).

#### **3.2.1.3.4. AXIN2**

Os membros da família de genes Wnt têm sido associados com fendas orais em seres humanos e camundongos (172,173,174). O gene *AXIN2* (*axis inhibition protein 2*) é um regulador negativo da via de WNT devido ao seu papel na degradação de  $\beta$ -catenina. Algumas mutações no gene *AXIN2* têm sido associadas com o aumento da susceptibilidade ao câncer (175,176,177), e em alguns casos foram detectados segregando juntamente com agenesia dentária familiar (175). Além disso, foi descrita associação de uma mutação de sentido trocado no gene *AXIN2* (rs2240308, P50S) com a etiologia de fenda de lábio com ou sem fenda de palato (174).

Diante desse pequeno resumo de alguns genes candidatos em fendas orais percebemos que, de fato, o conhecimento da base molecular das fendas orais é crítico para melhorar a acurácia do aconselhamento genético e a proposição de ações preventivas populacionais. Embora muito já se tenha avançado, ainda persistem lacunas importantes tanto em relação ao número e a contribuição de genes específicos em casos isolados e associados a outros defeitos congênitos, quanto às interações gene-gene e gene-ambiente e às correlações genótipo-fenótipo. A complexidade etiológica intrínseca das fendas orais, a heterogeneidade

de métodos de estudo empregados e o pequeno tamanho das casuísticas, são importantes obstáculos na caracterização destes aspectos.

Sendo assim, a identificação de genes envolvidos na etiologia das FLP tem sido objetivo de várias pesquisas com diferentes estratégias metodológicas, entre elas a seleção de genes candidatos baseados na análise do padrão de expressão gênica em modelos animais, estudos do tipo análise de ligação e estudos de associação alélica.

#### **4. Metodologias para o estudo de FLP isolada**

Atualmente, existem vários genes e loci genéticos que possuem participação na etiologia de FLP determinados a partir de várias linhas de evidências. Assim, uma variedade de abordagens genéticas tem sido utilizada para identificar vários genes e vias genéticas críticas envolvidas no desenvolvimento craniofacial.

Os genes candidatos para FLP têm sido propostos em abordagens comuns como estudos de associação alélica e análise de ligação (74,75,178). Outra estratégia comum seleciona genes candidatos de modelos animais baseados no padrão de expressão desses genes no desenvolvimento da face (179,180,181,182,183,184).

Portanto, a seleção de genes candidatos baseia-se, tipicamente, em conhecimentos prévios sobre os processos biológicos envolvidos e pode utilizar uma variedade de fontes, a partir de modelos animais a síndromes mendelianas com presença de fenda oral no seu fenótipo. Os modelos animais têm provado ser muito úteis na identificação de mutações genéticas responsáveis por malformações em humanos (95). Os camundongos com dismorfismos craniofaciais são particularmente apropriados como modelos para a

malformação do palato humano, uma vez que o desenvolvimento facial precoce e a morfologia dos camundongos são semelhantes à dos seres humanos (185,186).

Além disso, os genes candidatos também podem ser selecionados com base em seus papéis em síndromes que incluem fenda como parte do fenótipo (65). A análise de expressão é outra ferramenta poderosa na identificação de genes candidatos. O *Craniofacial and Oral Gene Expression Network Database* (COGENE, [www.FaceBase.org](http://www.FaceBase.org)) cataloga padrões de expressão gênica a partir de embriões humanos em estágios iniciais, enquanto o banco de dados extenso EMAGE cataloga informações abrangentes de expressão de genes para o desenvolvimento do embrião de camundogo (187).

As anomalias cromossômicas também podem fornecer pistas importantes sobre genes envolvidos na etiologia de fendas orais. Uma ampla pesquisa de deleções cromossômicas (188) e duplicações (189) foi realizada para identificar fenótipos significativamente associados com aneuploidia parcial.

O diagnóstico molecular de alterações cromossômicas ou alterações no número de cópias do DNA (*copy number variation, CNV*) em pacientes com FLP, principalmente síndrômicos, é revolucionado pela tecnologia de *microarray*, já que esta permite a análise de milhares de regiões do genoma simultaneamente para a detecção e localização de ganhos e perdas de material genético (190,191,192,193,194,195,196). Entretanto, esta metodologia não detecta alterações genômicas, eventos tecido-específico e aberrações pequenas (197).

Os rearranjos genômicos são causados por recombinação imprópria de cromossomos e incluem deleções, duplicações, translocações, inversões e podem ocorrer dentro ou entre cromossomos. A análise de pontos de quebra em rearranjos equilibrados identificou os genes *CLPTM1* (159), *SATB2* (198), *SUMO1* (199), e *FGFR1* (94) como genes

candidatos para fenda de lábio com ou sem fenda de palato, e implicou as regiões 9q e 17q como potenciais *loci* de risco (200).

Em contraste, as CNVs e microdeleções são ganhos ou perdas de segmentos de DNA que variam de kilobases para megabases submicroscópicas. Embora a maioria das CNVs sejam encontradas em formas sindrômicas de fendas, como a síndrome de DiGeorge e VWS, estudos recentes têm pesquisado sobre o papel das CNVs e microdeleções em formas não sindrômicas de fendas orais (174,190). Os genes implicados em fenda de lábio com ou sem fenda de palato a partir destas abordagens incluem *FGFR2* (190), *TFAP2A* (201), *SUMO1* (156), *GLI2*, *MSX1*, *FGF8*, *TCEB3* e *KIF7* (202).

Os estudos de análise de ligação baseiam-se na co-segregação de *loci* gênico com a doença e podem ser realizados em grandes famílias, ou em pares de parentes afetados. A triagem de todo o genoma tem sido realizada em casos de fenda de lábio com ou sem fenda de palato. Embora cada estudo tenha identificado vários sinais positivos, nenhum teve LOD scores atingindo significância. (74). Um grande estudo de ligação envolvendo 388 famílias de sete populações identificou os primeiros resultados de ligação significativa do genoma em 1q32, 2p13, 3q27-28, 9q21, 14q21-24 e 16q24 (74). O subsequente mapeamento da região 9q21 identificou o gene *FOXE1* como o gene causador de fenda oral neste *locus* (126,203,204).

Os estudos de associação também têm sido usados extensivamente para examinar genes candidatos em FLP. Estes estudos possuem a vantagem sobre os de análise de ligação ao usar uma amostra grande de casos que ocorrem isolados sem parentes afetados (205). Além disso, os estudos de associação exploram uma riqueza da literatura em biologia do

desenvolvimento que identifica genes específicos expressos durante fases críticas da formação do lábio ou do palato (206).

Ardinger et al. (207) foram os primeiros a usarem um desenho de estudo do tipo caso-controle para testar genes candidatos. Eles encontraram uma associação estatisticamente significativa entre a doença e dois dos 12 marcadores em cinco genes, com um marcador *TaqI* intrônico no gene *TGFA* mostrando a associação mais forte.

Os estudos de associação do tipo *genome-wide* (*Genome Wide Association Studies*, *GWAS*) tornaram-se amplamente utilizados por sua abordagem imparcial para identificar genes candidatos ou *locus* associados com características complexas, como fenda de lábio com ou sem fenda de palato. Birnbaum et al. (178) encontraram uma associação extremamente forte entre marcadores em 8q24 e fenda de lábio com ou sem fenda de palato em uma população alemã, a qual foi, posteriormente, replicada na população americana (208). No terceiro estudo de *GWAS*, Mangold et al. (145) identificaram sinais significativos perto do gene *VAX1* no cromossomo 10q25 e *NOG* no cromossoma 17q22. O quarto *GWAS* de fenda de lábio com ou sem fenda de palato foi realizado pelo *GENEVA Cleft Consortium study* (146). Na análise combinada de todas as populações, este estudo confirmou as associações anteriores com 1q32 e 8q24 e identificou novos *loci* em 1p22 e 20q12. Quando estratificada a partir da população, marcadores perto 1q32, 1p22 e 20q12 alcançaram significância de todo o genoma em asiáticos, enquanto que apenas o sinal 8q24 foi formalmente significativo nos europeus.

Na sua maioria, os estudos na população brasileira em FLP são do tipo caso-controle. De Aquino et al. (209) realizaram um estudo de associação para determinar o papel de 16 marcadores polimórficos dentro de 4 genes (*FGF12*, *VCL*, *CX43* e *VAX1*) em 300

pacientes com fenda de lábio com ou sem fenda de palato e 385 controles não afetados e não encontraram nenhuma associação. Por outro lado, Menezes et al. (210) investigaram a associação de 13 SNPs nos genes *WNT3A*, *WNT5A*, *WNT8A*, *WNT11*, *WNT3* e *WNT9B* com fenda de lábio com ou sem fenda de palato em 500 casos e 500 controles e encontraram associação com o gene *WNT3*.

O estudo aqui apresentado foi realizado no contexto do grupo de pesquisa nomeado “Historia Natural das Anomalias Craniofaciais”, certificado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e que tem como uma de suas propostas o Projeto Crânio-face Brasil (PCFB). O PCFB é multicêntrico e multiprofissional e conta com diferentes áreas de atuação, incluindo a Base Brasileira de Dados Clínicos e Familiares de Fendas Orofaciais Típicas (BBDCF) (211), que à época do início deste estudo contava com cerca de 800 registros completos de indivíduos examinados por médico geneticista. Utilizando método padronizado de coleta de dados clínicos e incluindo resultados de investigações citogenéticas e moleculares, esta base de dados, agora em sua versão eletrônica (*CranFlow - Base Brasileira de Fendas Orais*), permite o registro do seguimento clínico do paciente, garantindo a acurácia diagnóstica.

A classificação proposta pela *International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research* é a adotada pela *CranFlow*. De acordo com esta classificação estão excluídos outros defeitos *major*, tais como cardiopatia, defeitos de sistema nervoso central e anomalias de trato urinário, frequentemente descritos em indivíduos com FLP não síndrômica (212, Anexo I).

Apesar do conhecimento da função de vários genes, ainda persistem lacunas importantes tanto em relação ao número e a contribuição de genes específicos em casos

isolados e associados, quanto às interações gene-gene e às correlações genótipo-fenótipo. Com os avanços das técnicas de genotipagem, atualmente é possível se testar múltiplos marcadores genômicos simultaneamente em genes candidatos. Nesse sentido, a técnica de *OpenArray* permite a genotipagem de até 256 SNPs customizados de vários genes candidatos.

#### **4.1. Plataforma *TaqMan*<sup>®</sup>*OpenArray*<sup>™</sup> Genotyping**

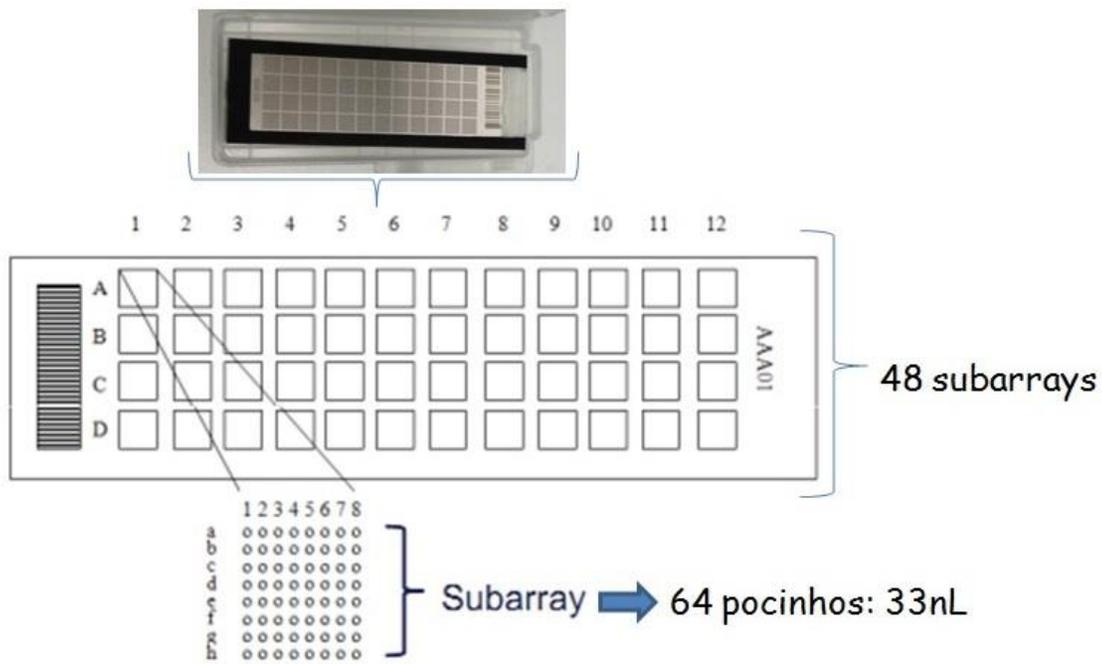
A plataforma *OpenArray*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) é uma tecnologia de alto rendimento (*high-throughput*) que utiliza reação em cadeia da polimerase (*PCR*) baseada em reagentes fluorescentes para fornecer detecção qualitativa de sequências alvos empregando análise pós-*PCR* (*endpoint*).

Um experimento de genotipagem é um experimento *endpoint* utilizado para determinar os genótipos de amostras desconhecidas. Com esse tipo de experimento consegue-se diferenciar dois alelos de um SNP. Assim, este tipo de ensaio determina se as amostras desconhecidas são: 1) Alelo 1 homozigotas (amostras com apenas o alelo 1), 2) Alelo 2 homozigotas (amostras com apenas o alelo 2) ou 3) Heterozigotas (amostras com ambos alelos 1 e 2).

Nos experimentos de genotipagem *TaqMan*, a *PCR* inclui uma sonda fluorescente específica marcada para cada alelo do SNP alvo. Essas sondas fluorescentes contêm diferentes corantes repórteres para diferenciar cada alelo. Os ensaios são pré-carregados nas lâminas de genotipagem e nelas existem 3072 poços de reação que podem

acomodar um volume de reação de 33 nL. Dessa forma, é possível detectar até 3072 SNPs, mutações de ponto ou pequenas deleções e inserções em uma única lâmina de genotipagem.

Como se mostra na figura abaixo, a lâmina de genotipagem é dividida em 48 *subarrays*; cada um consistindo em 64 poços. A superfície desses poços apresenta propriedades hidrofóbicas, enquanto o interior dos poços (local onde já estão as sondas e os *primers* necessários para as reações) apresenta características hidrofílicas. (Figura 2).



**Figura 2.** Ilustração da lâmina de *OpenArray*<sup>™</sup>, contendo os 48 *subarrays* e, em destaque, a esquematização de um *subarray* com 64 poços, cada um apresentando o volume de 33nL (Modificado de *Applied BioSystems*, 213).

Cada ensaio contém 2 *primer's* (*forward* e *reverse*.), 2 sondas (uma para cada alelo do SNP), um corante repórter na extremidade 5'UTR (*untranslated region*) de cada sonda (corante VIC<sup>®</sup> ligado à extremidade 5'UTR da sonda do alelo 1 e corante FAM<sup>™</sup> ligado

à extremidade 5'UTR da sonda do alelo 2), um *quencher* não fluorescente (Q) na extremidade 3'UTR da sonda (como o supressor não fluoresce, os sistemas de *PCR* em tempo real podem medir contribuições do corante repórter com precisão) (Figura 3) e fluoróforo ROX que serve para confirmar que o ensaio foi depositado na lâmina de *OpenArray*<sup>®</sup>.

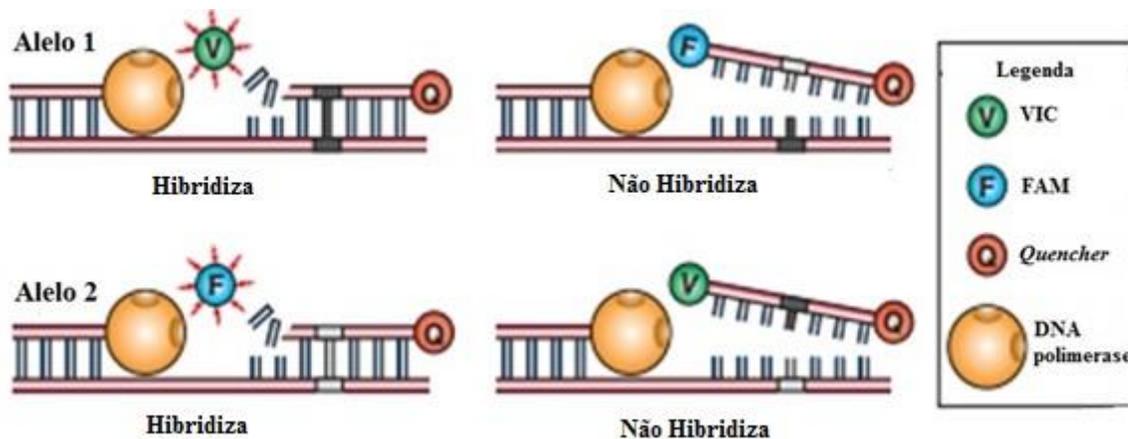
Além disso, as sondas possuem *minor groove binder* (MGB), que é uma modificação que aumenta a temperatura de fusão ( $T_m$ ) das sondas sem o aumento do comprimento destas (214,215), assim, permitindo a concepção de sondas mais curtas. Conseqüentemente, as sondas *TaqMan MGB* apresentam maiores diferenças de valores de  $T_m$  entre sondas ligadas e não ligadas; e maiores diferenças nos valores de  $T_m$  fornecem uma genotipagem precisa.



**Figura 3.** Ilustração de uma sonda *TaqMan MGB*. F - Fluoróforo e Q - Quencher não fluorescente (supressor).

Durante a *PCR*, cada sonda hibridiza especificamente com a sua sequência complementar entre os primers *forward* e *reverse*. A enzima DNA polimerase pode clivar apenas sondas que se hibridizam ao alelo do SNP específico. A clivagem separa o corante repórter do *quencher* aumentando substancialmente a fluorescência do corante repórter. Assim, os sinais de fluorescência gerados durante a amplificação por *PCR* indicam que os alelos estão presentes na amostra.

Uma incompatibilidade entre uma sonda e um alelo de um SNP reduz significativamente a eficiência de hibridação da sonda. Como a enzima DNA polimerase não desloca a sonda não correspondente ao fragmento, por conseguinte ela não liberta o corante repórter. Em outras palavras, a não hibridização não gera sinal de fluorescência. A figura 4 ilustra os resultados de hibridização e não hibridização entre a sequência alvo e as sondas em ensaios de genotipagem *TaqMan* (216).



**Figura 4.** Representação esquemática de resultados de hibridização e não hibridização entre as sequências de sondas e a sequência alvo em ensaios de *OpenArray*<sup>®</sup> (Adaptado de *Applied BioSystems*, 213).

Essa plataforma é constituída pelos seguintes componentes: 1) *OpenArray*<sup>™</sup> *AccuFill*<sup>®</sup> *System* (*Applied Biosystems*), que é um robô pipetador que carrega as amostras na lâmina de genotipagem *TaqMan*<sup>®</sup> *OpenArray*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*), interligado a um computador para controlar as atividades através do programa *OpenArray*<sup>™</sup> *AccuFill*<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*); 2) *OpenArray*<sup>®</sup> *Case Sealing Station* (*Applied Biosystems*), onde ocorre a selagem das cases de *TaqMan*<sup>®</sup> *OpenArray*<sup>®</sup> *Genotipagem* (*Applied Biosystems*); 3)

*OpenArray™NTCycler®* (Applied Biosystems), que executa as imagens das lâminas de genotipagem, conectado a um computador. Este possui um programa, *OpenArray™ Genotyper* (Applied Biosystems), que analisa os dados da execução e em seguida denomina os genótipos (Figura 5).



**Figura 5.** Plataforma *TaqMan® OpenArray™* (Applied BioSystems).

Os ensaios de genotipagem requerem dois passos: ciclagem térmica (amplificação por PCR), seguida por detecção de sinais de fluorescência de pontos resultantes. Enquanto o *OpenArray™NTCycler®* (Applied Biosystems) realiza a detecção de *endpoint*, é preciso um termociclador independente para realizar a amplificação por PCR. Um termociclador qualificado para utilização com o sistema *TaqMan® OpenArray®* (Applied Biosystems) é o *Duo Block GeneAmp®PCR System 9700* (Applied Biosystems).

O equipamento *OpenArray™NTCycler®* coleta dados de fluorescência após a realização do ciclo térmico (PCR). Um ponto de coleta de dados (*datapoint*) no *OpenArray™NT Cycler®* é composto por três fases: 1. Excitação: o equipamento ilumina todos os poços de passagem da lâmina de genotipagem, excitando os fluoróforos em cada

reação. 2. Emissão: o sistema ótico do aparelho coleta a fluorescência residual emitida a partir dos orifícios de passagem da lâmina. A imagem resultante consiste apenas de luz que corresponde à gama de comprimentos de onda de emissão. 3. Coleção: o instrumento monta uma representação digital da fluorescência residual recolhida durante um intervalo de tempo fixo, em seguida, armazena a fluorescência em imagem bruta para análise.

Depois de uma corrida, o programa *OpenArray™ Genotyper (Applied Biosystems)* usa regiões óticas de interesse (ROI), corantes e dados de calibração para determinar a localização e a intensidade dos sinais da fluorescência em cada leitura, o corante associado com cada sinal de fluorescência, e o significado do sinal.

Cada poço da lâmina de genotipagem pode conter um único ensaio. O número de ensaios na lâmina de genotipagem e o número de amostras nela contidas dependem do formato da lâmina. O número máximo de SNPs possível de se analisar nessa lâmina é 256 (Tabela 1).

**Tabela 1.** Formatos oferecidos para a elaboração das lâminas de genotipagem.

Ensaio	Amostras	Ensaio por <i>subarray</i>
16	144	3
32	96	2
64	48	1
128	24	0,5
192	16	0,3
256	12	0,25

A possibilidade de utilizar a técnica de *OpenArray* surgiu como uma alternativa interessante de se verificar a contribuição de genes descritos como relacionados à gênese de FOT em diferentes tipos de estudo. Nesta proposta, utilizou-se esta estratégia em uma

amostra fenotipicamente homogênea da população brasileira em estudo do tipo caso-controle.

## ***OBJETIVO***

### **1. Objetivo Geral**

Contribuir para a identificação de genes envolvidos na determinação das fendas labiopalatais.

### **2. Objetivo Específico**

Investigar a associação entre 253 *SNPs* em 39 genes candidatos e FLP isolada em uma amostra da população brasileira.



## *CASUÍSTICA e MÉTODOS*

### **1. Desenho do estudo**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 059/2008) (n° 714/2008) (Anexo II). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo III).

Este estudo do tipo caso-controle foi composto por 537 indivíduos. O tamanho amostral foi calculado por meio de regressão logística utilizando o programa estatístico R (217). Para avaliar o poder estatístico para detectar associação genética foi realizada uma estimativa do poder estatístico *post-hoc* da amostra por meio do programa *GPower* (218), utilizando os seguintes parâmetros: teste de regressão logística; *two-tail*; OR: 1,5;  $\alpha = 0,005$  e  $n = 537$ . Assim, foi analisado o poder estatístico para a regressão logística e essa estimativa foi de 81,29%. O cálculo do nível de significância  $\alpha$  foi corrigido para múltiplos testes por meio da correção de Bonferroni e baseado no gene com maior número de polimorfismos (10 SNPs), visto que este é um estudo de genes candidatos, e não de SNPs candidatos.

O grupo de casos foi composto por 182 indivíduos com FLP isolada (99 homens e 83 mulheres) registrados na BBDCF do PCFB. Todos os casos foram examinados por geneticista clínico utilizando o mesmo protocolo clínico. Os sujeitos foram recrutados entre 2009 e 2013 a partir de oito centros de pesquisa participantes em três diferentes regiões do Brasil (região Sudeste: Campinas e São José do Rio Preto, região Sul: Curitiba, Joinville e

Porto Alegre; região Nordeste: Maceió, Fortaleza e Natal). Todos os pacientes foram reavaliados durante a execução desse estudo para se garantir o diagnóstico de FLP isolada.

Conforme mencionado anteriormente, os casos foram classificados como fenda labiopalatal isolada de acordo com a *International Clearinghouse for Birth Defects and Surveillance and Research*. De acordo com esta classificação estão excluídos outros defeitos *major*, tais como cardiopatia, defeitos de sistema nervoso central e anomalias de trato urinário, frequentemente descritos em indivíduos com FLP não sindrômica (212, Anexo I)

O grupo controle foi recrutado de três diferentes regiões do Brasil (Sudeste, Sul e Nordeste) e foi composto por 355 indivíduos fenotipicamente normais e não aparentados (140 homens e 215 mulheres) e sem história familiar de fenda oral em três gerações.

## **2. Estimativa da estratificação da amostra**

A fim de avaliar a presença de estratificação da amostra, o que poderia gerar resultados de associação genética não confiáveis, foram genotipados 60 InDels (*Small insertions and deletions*), sendo quarenta previamente validados como marcadores informativos para ancestralidade (219). Por meio do *software STRUCTURE* v.2.3.4 (220, 221) foi determinada a ancestralidade genômica de cada sujeito, em um modelo assumindo  $K = 3$  populações com base na tri-origem híbrida da população brasileira. Além disso, o valor de  $F_{st}$  (*Fixation index*) foi estimado por meio do programa *ARLEQUIN* v.3.5.1.3 (222). Esta parte do estudo foi realizada em colaboração com os professores Andréa Kelly Campos Ribeiro dos Santos e Sidney Emanuel Batista dos Santos do Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará.

### 3. Genotipagem

A genotipagem foi realizada com o sistema *TaqMan®OpenArray™ Genotyping* (Applied Biosystems). Cinquenta lâminas foram customizadas para este estudo. Cada lâmina apresentava seu código de barras e um nome próprio. Para cada 10 lâminas de *OpenArray®*, havia um *TaqMan®OpenArray® Genotyping Accessories Kit* (Applied Biosystems) contendo 10 minipipetas de plástico lacradas com 5mL do líquido de imersão cada, 2 seringas contendo 10 mL de goma fotossensível para a selagem das lâminas e 10 *cases* de vidro. Fora desse *Kit*, foram necessários 5 caixas de ponteiros específicas, um tubo *TaqMan®OpenArray™ Genotyping Master Mix* e 6 placas de 384 poços (Applied Biosystems). Esse sistema exige uma série de etapas para obtenção de resultados apropriados para análise, conforme descritas abaixo.

#### 3.1.Etapas:

- 3.1.1. Seleção dos genes e seus polimorfismos
- 3.1.2. Desenho e síntese das lâminas
- 3.1.3. Coleta e extração das amostras
- 3.1.4. Verificação da concentração e pureza das amostras
- 3.1.5. Diluição das amostras
- 3.1.6. Realização dos experimentos utilizando a plataforma  
*TaqMan®OpenArray™ Genotyping*
- 3.1.7. Análise dos Dados

### 3.1.1. Seleção dos genes e seus polimorfismos

A escolha dos genes foi baseada em dados da literatura científica: estudos de associação, estudos de ligação, em modelos animais (74, 110, 125, 142, 145, 152, 173, 203, 223-227) e resultados anteriores do PCFB. Entre estes, destacam-se os genes *TCEB3* (*transcription elongation factor B3*), *FGF22* (*fibroblast growth factor 22*), *KIF7* (*kinesin family member 7*) e *SOX7* [*SRY (sex determining region Y)-box 7*] detectados a partir a técnica de *SNP array* em pacientes com FOT (202).

Para investigar os genes selecionados foi utilizado um programa que seleciona SNPs que não necessariamente foram associados com a etiologia de FLP, mas que baseados em suas posições conseguem rastrear o gene e, dessa maneira, é possível dizer se esse gene está associado à FLP isolada.

A seleção dos SNPs para cada gene escolhido foi realizada por meio do programa *SNPbrowser 4.0* (*Applied Biosystems*). Foram selecionados 253 *SNPtags* em 39 genes candidatos. Esses SNPs foram selecionados usando os dados disponíveis no banco de dados *HAPMAP* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando as populações CEU, CHB, JPT e YRI como referência, e empregando o algoritmo *pairwise tagging* com os seguintes parâmetros: *minor allele frequency* (MAF) de 5% e *pairwise r<sup>2</sup>* de 80%. O programa seleciona o número de SNPs necessários para abranger o gene e quais são eles. Estes SNPs são utilizados em estudos de associação indireta, ou seja, o SNP que for associado com o fenótipo provavelmente não é a variante funcional; mas pode estar em desequilíbrio de ligação com a variante funcional patogênica relacionada ao fenótipo estudado. A lista de

genes selecionados e o número de SNPs genotipados por gene são mostrados na Tabela 2. O

Apêndice I mostra quais são os SNPs selecionados para cada gene.

**Tabela 2.** Lista de genes selecionados e o número de SNPs genotipados por gene.

Gene	Localização cromossômica	Nº de SNPs genotipados
<i>TCEB3</i>	1p36.11	4
<i>LHX8</i>	1p31.1	9
<i>IRF6</i>	1q32.2	8
<i>WNT3A</i>	1q42.13	12
<i>SUMO 1</i>	2q33.1	6
<i>WNT5A</i>	3p14.3	8
<i>MSX1</i>	4p16.2	2
<i>SPRY1</i>	4q28.1	4
<i>Wnt8A</i>	5q31.2	4
<i>MSX2</i>	5q35.2	4
<i>PRSS35</i>	6q14.2	10
<i>TFAP2A</i>	6p24.3	7
<i>HOXA2</i>	7p15.2	2
<i>SHH</i>	7q36.3	1
<i>SOX7</i>	8p23.1	7
<i>PTCH1</i>	9q22.3	10
<i>FOXE1</i>	9q22.33	2
<i>VAX1</i>	10q25.3	3
<i>TBX10</i>	11q13.2	6
<i>WNT11</i>	11q13.5	11
<i>SPRY2</i>	13q31.1	5
<i>PAX9</i>	14q13.3	13
<i>BMP4</i>	14q22.2	3
<i>TGFB3</i>	14q24.3	12
<i>JAG2</i>	14q32.33	6
<i>GREM1</i>	15q13.3	13
<i>KIF7</i>	15q26.1	5
<i>DVL2</i>	17p13.1	6
<i>ERBB2</i>	17q12	8
<i>RARA</i>	17q21.2	7
<i>WNT9B</i>	17q21.32	9
<i>AXIN2</i>	17q24.1	11
<i>FGF22</i>	19p13.3	2
<i>TGFB1</i>	19q13.2	7
<i>BCL3</i>	19q13.31	2
<i>APOC2</i>	19q13.32	3
<i>CLPTM1</i>	19q13.32	11
<i>TBX1</i>	22q11.21	8
<i>TBX22</i>	Xq21.1	2

Observação: O número mínimo de polimorfismos para cobrir o gene foi de 10 SNPs, entretanto alguns SNPs foram selecionados a mais em alguns genes por determinação do desenho da lâmina.

### 3.1.2. Desenho e síntese das lâminas

Dentre os formatos de lâminas de *OpenArray*<sup>®</sup> disponíveis, foi escolhido o de 256 ensaios/12 amostras, contendo um ensaio por *subarray*. Todas as sequências de interesse haviam sido desenhadas anteriormente pela empresa *Applied Biosystems*, constando do banco de dados “*Made to order*”.

Após a verificação das sequências feita pela empresa, foram elaborados os ensaios contendo um par de *primers* em comum e duas sondas, uma contendo a sequência selvagem, sendo marcada com o fluoróforo VIC<sup>®</sup> e outra contendo a sequência mutante, marcada com o fluoróforo FAM<sup>®</sup>.

As informações das lâminas foram obtidas fazendo o *download* no site: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Product-Types/download-openarray-tpf-and-spf-plate-files.html>, por meio do número de ordem de serviço e *Lot Number*. Os 50 arquivos de extensão *spf* (*SNP Plate File*) foram utilizados como referência de cada lâmina na realização da leitura no *OpenArray*<sup>™</sup> *NTCycler*<sup>®</sup>.

Outros arquivos, contendo as informações gerais dos ensaios, como sequência dos *primers*, das sondas, entre outras também estavam presentes na pasta de arquivo, sendo um deles em *pdf* (*portable document format*) e outro na extensão *.txt* (*text file*).

### 3.1.3. Coleta e extração das amostras

Foram coletados de 10 a 20 ml de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 1,0 ml de EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico 2H<sub>2</sub>O) a 10% e pH 8,0 como anti-coagulante. Para obtenção das amostras de DNA genômico foi utilizado o *kit* de extração *QIAamp® DNA Blood Midi (Qiagen)* (Anexo IV). As amostras de DNA já extraídas pelo método de extração fenol-clorofórmio (Araújo et al., 1996 – Anexo V) foram purificadas com o *kit MilliUni* (Anexo VI).

### 3.1.4. Verificação da concentração e pureza das amostras

A reprodutibilidade, a acurácia e a precisão da técnica *TaqMan®OpenArray™* estão diretamente relacionadas à integridade das amostras, à concentração correta e a pureza das amostras. Para isso, utilizou-se o equipamento *Epoch (BioTeck)* para verificação da pureza e concentração das amostras. A quantificação e a pureza do DNA foram obtidas por leitura de absorvância na região do comprimento de onda ultravioleta (UV) de 260nm (quantificação de ácidos nucleicos) e 280nm (quantificação de proteínas).

O grau de pureza do DNA foi avaliado com base na razão entre as leituras de 260nm e 280nm uma vez que valores iguais ou superiores a 1,8 para essa relação sugerem que o DNA está essencialmente puro e passível de ser usado nessa técnica. A média da razão 260nm/280nm foi de 1,8 e da razão 230nm/280nm foi de 2,0. Toda esta precisão foi necessária porque para a realização do experimento eram necessárias 250 cópias haplóides do DNA do

indivíduo, e isto só é obtido caso as amostras apresentem as características acima mencionadas.

### **3.1.5. Diluição das amostras**

Todas as amostras apresentaram valores de concentração superior a 50ng/μL, sendo necessária a realização de diluições simples. O volume final das diluições foi de 20μL. Para cálculos, foi utilizada a fórmula de diluições simples  $C1.V1=C2.V2$ , onde C1 e V1 são as concentrações e volumes iniciais, respectivamente. As variáveis C2 e V2 refere-se às concentrações e volumes finais, que obedeceram aos valores de 50ng/μL e 20μL, respectivamente. Após os cálculos, o volume inicial (V1) calculado foi transferido para tubos e completado até o volume final de 20μL com água de injeção. Depois de diluídas as amostras, foi verificada novamente a concentração destas. Sendo assim, todas as amostras foram uniformemente quantificadas e diluídas a 50ng/μL.

### **3.1.6. Realização dos experimentos utilizando a plataforma *TaqMan®OpenArray™***

#### ***Genotyping***

A realização dos ensaios de *Openarray®* é dividida em várias etapas (Protocolo descrito no ANEXO VII):

3.1.6.1.Preparo das amostras

3.1.6.2.Distribuição das amostras nas lâminas de *OpenArray®*

3.1.6.3.Inserção da lâmina de *OpenArray®* na *case*

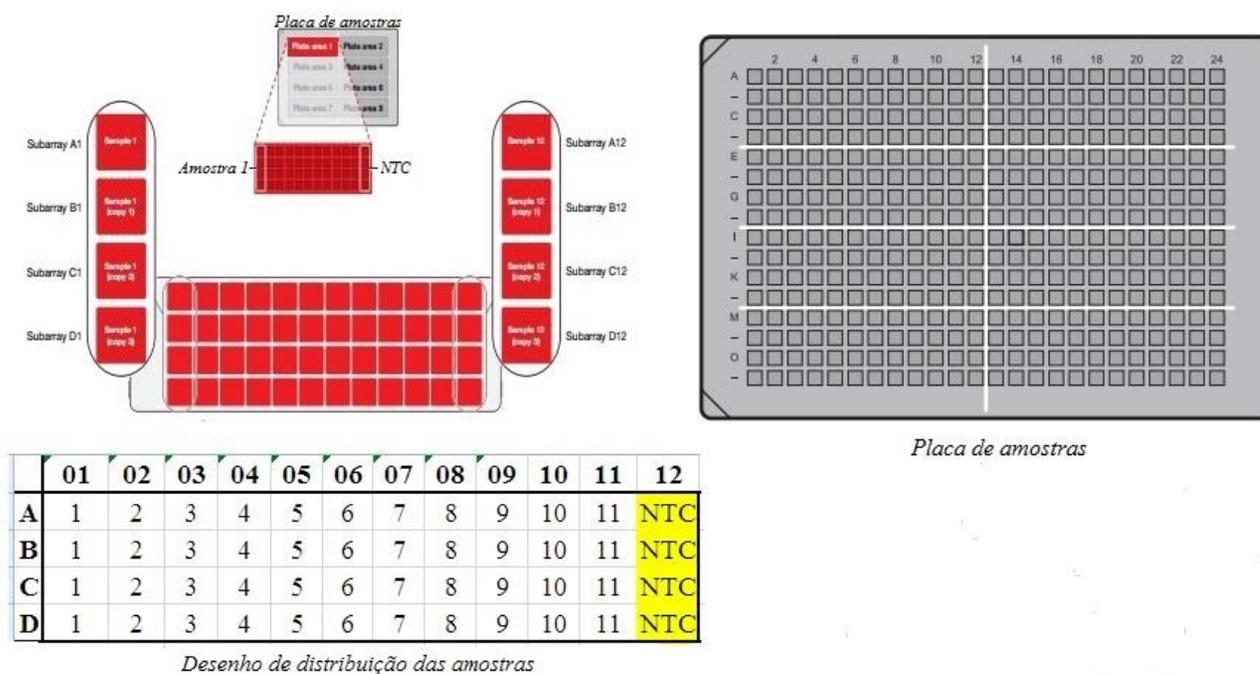
3.1.6.4.Selagem das *cases*

### 3.1.6.5. Termociclagem

### 3.1.6.6. Leitura das lâminas de *OpenArray*<sup>®</sup>

#### 3.1.6.1. Preparo das amostras

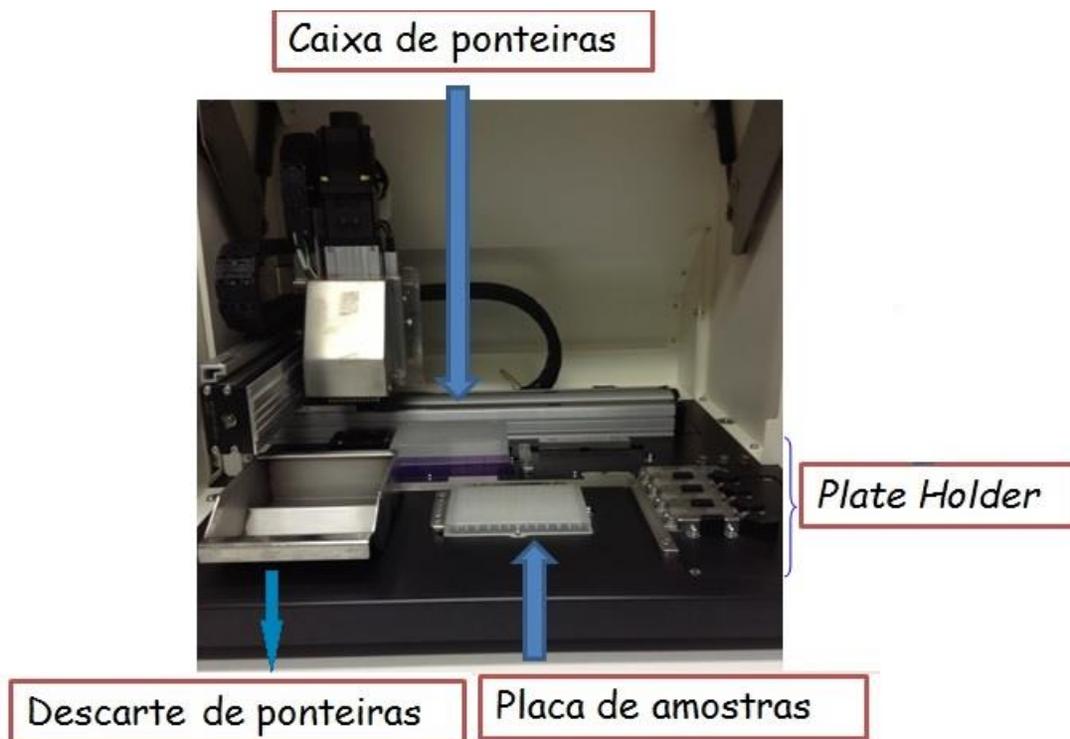
Em uma placa de 384 poços, foram colocados 2,5 µL da amostra devidamente quantificados e diluídos e 2,5 µL do *TaqMan*<sup>®</sup> *OpenArray*<sup>™</sup> *Master Mix* em cada poço previamente identificado de acordo com o estipulado pela empresa. Além disso, em cada lâmina deveria ter controles negativos (NTC), que são amostras que contêm água ou tampão e não devem amplificar (Figura 6). Em seguida, a placa foi selada com o adesivo de selagem de alumínio (*Thermo Scientific*<sup>®</sup>) para evitar evaporação da mistura Amostra/*Master Mix*.



**Figura 6.** Ilustração da placa 384 poços de amostras e esquema de sua distribuição na lâmina de *OpenArray*<sup>®</sup>.

### 3.1.6.2. Distribuição das amostras nas lâminas de *OpenArray*<sup>®</sup>

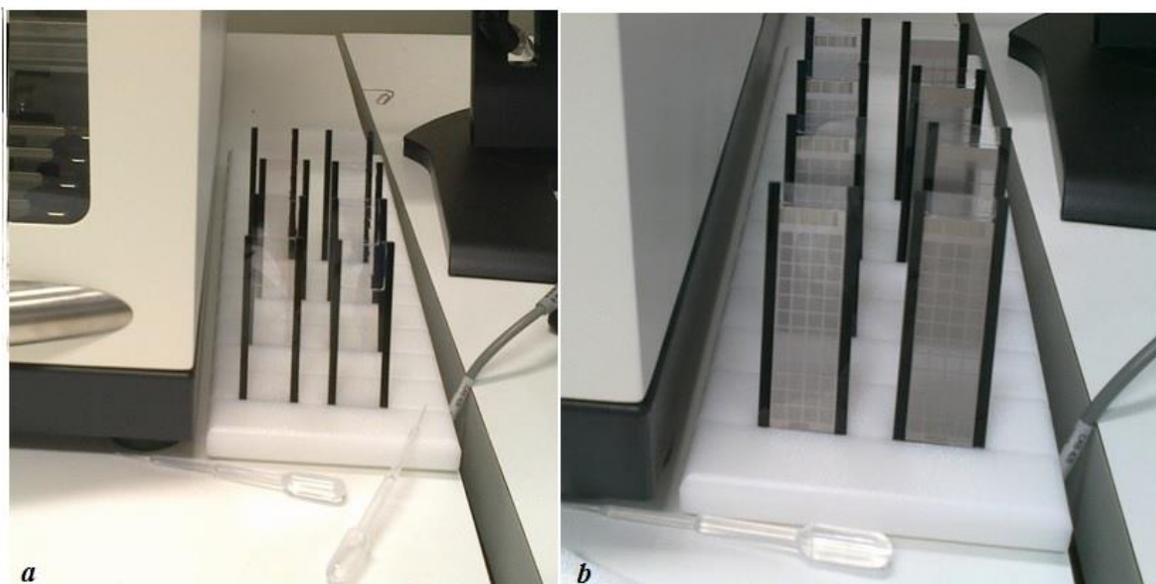
Foi utilizado um robô pipetador, o *OpenArray*<sup>®</sup>*AccuFill*<sup>™</sup>*System* (*Applied Biosystems*), para a distribuição das amostras contidas na placa de 384 poços nas lâminas de *OpenArray*<sup>™</sup>. No interior do *OpenArray*<sup>®</sup>*AccuFill*<sup>™</sup>*System* foi inserida a caixa de ponteiras específicas e a placa de 384 poços contendo a mistura de *Master Mix* e das amostras. Em seguida, as lâminas de *OpenArray*<sup>™</sup> foram posicionadas no *plate holder* para serem carregadas com o conteúdo da placa de 384 poços (Figura 7). Todas as operações realizadas neste equipamento pipetador foram coordenadas utilizando o *software OpenArray*<sup>®</sup>*AccuFill*<sup>™</sup>, presente em um computador interligado ao aparelho.



**Figura 7.** Foto do interior do equipamento *OpenArray*<sup>®</sup>*AccuFill*<sup>™</sup>*System*.

### 3.1.6.3. Inserção da lâmina de *OpenArray*<sup>®</sup> na case

Enquanto as lâminas de *OpenArray*<sup>®</sup> estavam sendo carregadas com as amostras, as *cases* de vidro, usadas para colocar as lâminas de *OpenArray*<sup>®</sup>, foram preparadas (Figura 8). Para isso, adicionou-se o líquido de imersão o suficiente para cobrir a lâmina de *OpenArray*<sup>®</sup> quando inserida na case. Esse passo permite a estabilização das reações na lâmina e cria um ambiente ideal para a reação de amplificação, ligação e clivagem das sondas.



**Figura 8.** Foto das *cases* preparadas (a) e depois com as lâminas já inseridas na case (b).

### 3.1.6.4. Selagem das *cases*

Após a inserção das lâminas nas *cases* contendo o líquido de imersão, realizou-se a etapa de selagem das *cases* (Figura 9), que consistiu na adição de uma goma fotossensível

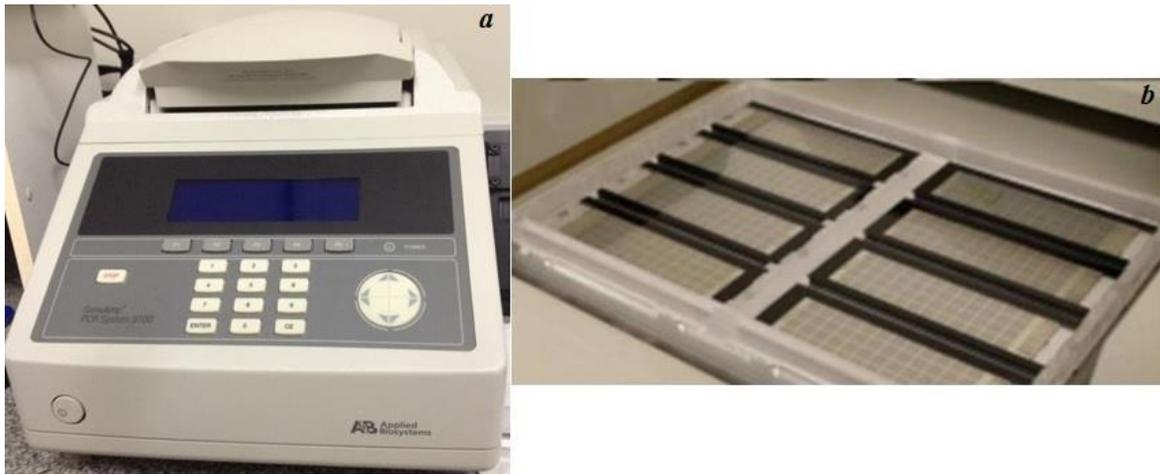
na extremidade da lâmina para vedação. Posteriormente, já na estação de selagem, a goma foi exposta por 2 minutos sobre ação de luz ultravioleta, solidificando-a.



**Figura 9.** Foto da selagem das cases na estação de selagem.

### 3.1.6.5. Termociclagem

As lâminas nas *cases* foram posicionadas no local demarcado no termociclador, realizando a termociclagem destes no equipamento *Dual Flat Block GeneAmp® PCR System 9700 (Applied BioSystems)* (Figura 10). A termociclagem das lâminas foi realizada seguindo o protocolo de 50 ciclos a 95°C por 45 segundos para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 94°C por 13 segundos para o anelamento dos *primers* e das sondas. Por último, houve a queda da temperatura para 53°C por 2 minutos e 14 segundos, ocorrendo a extensão das novas fitas e a hidrólise das sondas *TaqMan®*. Essa termociclagem teve duração de aproximadamente quatro horas.



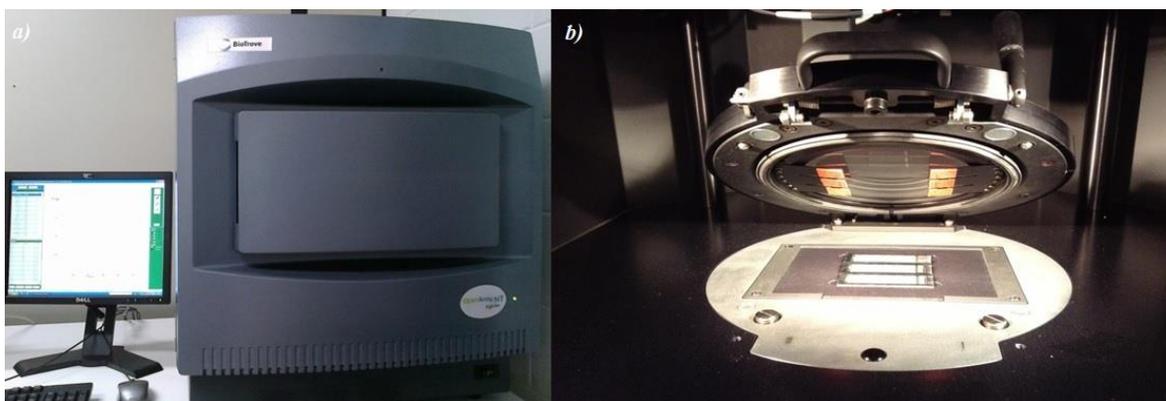
**Figura 10.** (a) Foto do termociclador *Dual Flat Block GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700* (*Applied BioSystems*). (b) Interior do termociclador com as lâminas.

#### 3.1.6.6. Leitura das lâminas de *OpenArray<sup>®</sup>*.

Para a obtenção dos resultados, utilizou-se o *OpenArray<sup>™</sup> NT Cycler* (*Applied BioSystems*) (Figura 11). Este equipamento é responsável pela captura da fluorescência das sondas hidrolisadas. O aparato é coordenado por um computador interligado, utilizando o programa *OpenArray<sup>™</sup> SNP Genotyping Analysis* (*Applied BioSystems*), no qual é possível realizar a leitura de 3 lâminas por vez.

Um conjunto de câmeras CCD (*Charge-coupled Device*) posicionadas no interior do equipamento capturou a fluorescência emitida nos ensaios e estas foram transformadas em números de acordo com o comprimento de onda, que varia de acordo com o repórter detectado (VIC<sup>®</sup> ou FAM<sup>®</sup>) e sua intensidade. No programa *OpenArray<sup>™</sup> SNP Genotyping Analysis*, estes números passam por algoritmos e são convertidos em novos valores e em

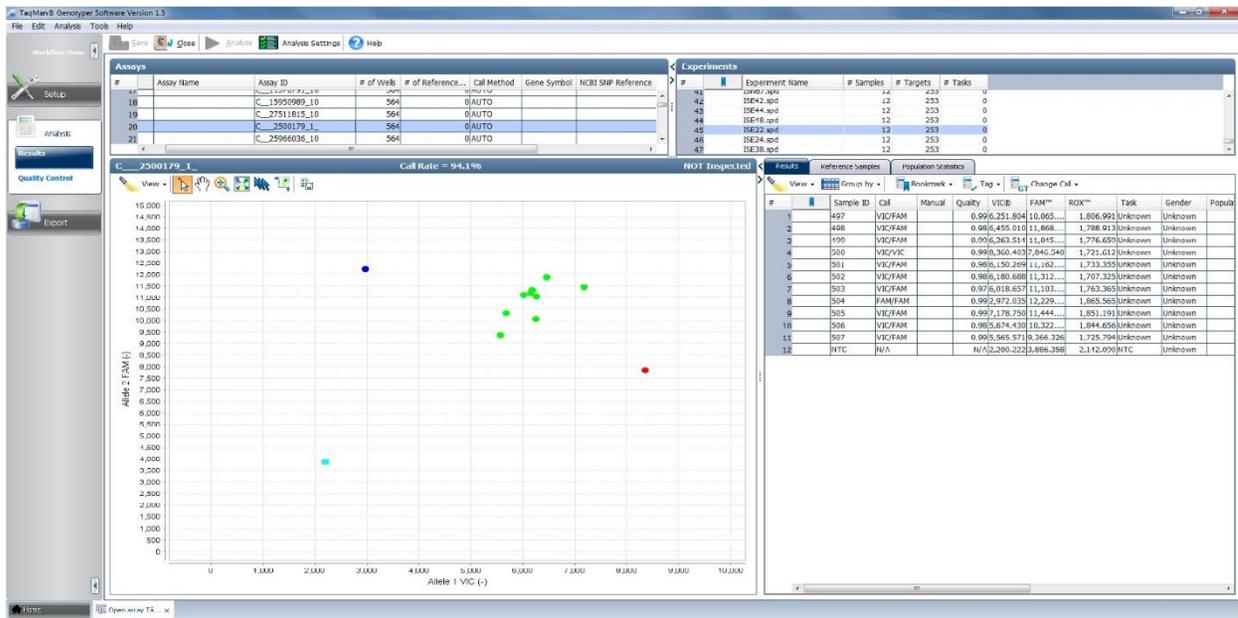
*clusters*, separando os indivíduos em homozigotos selvagem, heterozigotos e homozigotos mutantes. Os indivíduos homozigotos selvagens são representados pelo *cluster* de cor vermelho, indicando que ambos os alelos do indivíduo tiveram a sonda contendo o repórter VIC<sup>®</sup> pareada e hidrolisada. O *cluster* de cor verde representa os indivíduos heterozigotos, que apresentaram um alelo selvagem e outro com a sequência mutante, apresentando, assim, as sondas VIC<sup>®</sup> e FAM<sup>®</sup>, respectivamente, aneladas e hidrolisadas. Já o *cluster* de cor azul, mostra os indivíduos com ambos os alelos mutantes, contendo apenas a hidrólise da sonda FAM<sup>®</sup> no experimento.



**Figura 11.** a) Foto do equipamento *OpenArray™ NT Cycler* acoplado a um computador; b) Foto do interior do *OpenArray™ NT Cycler* com as lâminas já posicionadas.

### 3.1.7. Análise dos dados

Para melhor análise, os arquivos gerados no *OpenArray™ NT Cycler* (*Applied BioSystems*) foram salvos e importados em outro programa com maior número de ferramentas e opções para análise, o *TaqMan® Genotyper Software* (*Applied BioSystems*) (Figura 12).



**Figura 12.** Visão geral do programa *TaqMan<sup>®</sup> Genotyper*.

#### 4. Análise estatística

A análise da frequência (*Minimum allele frequency* - MAF) e do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) foram realizadas pelo programa *HAPLOVIEW*. Foram aceitos para a análise de associação apenas SNPs com MAF > 0,05 e HWE p-value > 0,05. Na análise do desequilíbrio de ligação (*Linkage disequilibrium*-LD) foram aceitos SNPs com  $r^2 < 0.8$ .

A análise de associação foi realizada por meio de regressão logística, utilizando o programa *PLINK* (229). Os resultados foram ajustados para múltiplos testes pela correção de Bonferroni. Posteriormente, os resultados foram confirmados utilizando uma segunda análise por meio do FDR (*False Discovery Rate*). A análise de regressão *stepwise* foi realizada utilizando o programa *R* (217).

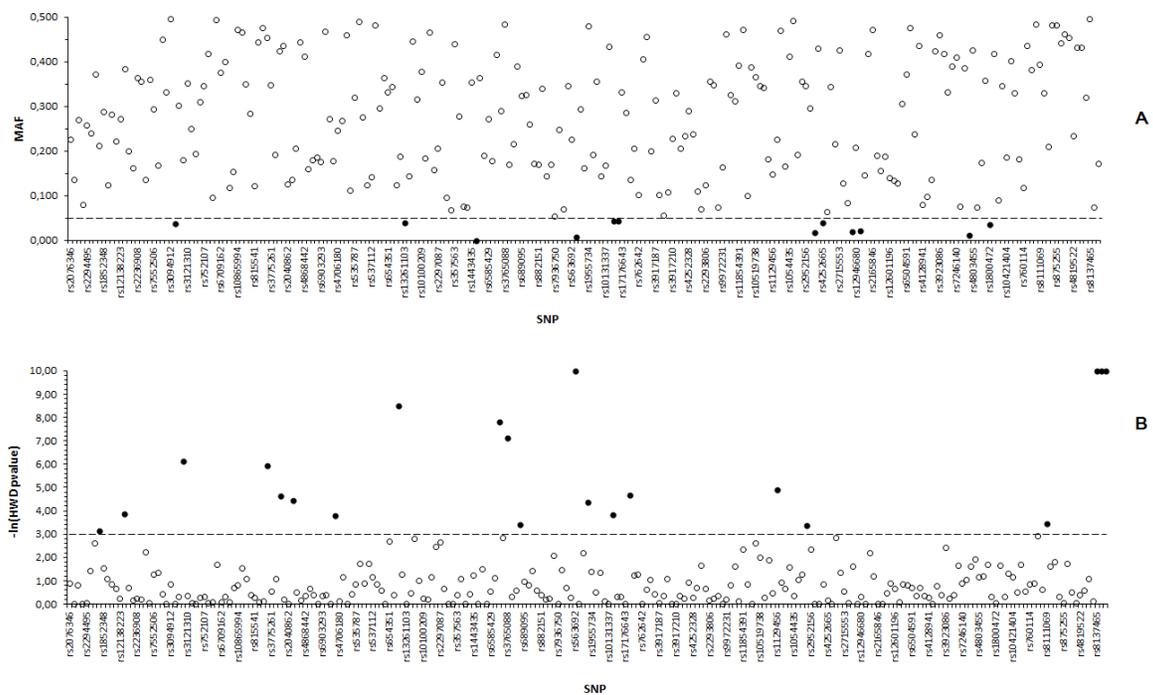
## 5. Análise de predição de mutações *in silico*

Algoritmos computacionais foram utilizados para analisar os efeitos de mutações de sentido trocado na estrutura ou na função da proteína codificada. A sequência de aminoácidos testada foi obtida a partir do banco de dados *do National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dois algoritmos foram utilizados para prever o impacto destas substituições de aminoácidos sobre a atividade da proteína: *PolyPhen-2* (230) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e SIFT (231) (<http://sift.jcvi.org/>).

# RESULTADOS

## 1. Genotipagem

A taxa de sucesso de genotipagem para os 253 SNPs em 537 amostras foi em média de 94,88% ( $\pm 3,98\%$ ). Duzentos e trinta e dois SNPs estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* na amostra. Os 21 SNPs que não estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e os 12 SNPs que apresentaram MAF abaixo de 5% foram excluídos da análise de regressão logística (Figura 13). A taxa de SNP com LD maior que 0,8 foi entre dois a quatro SNPs em 16 genes (Apêndice II).

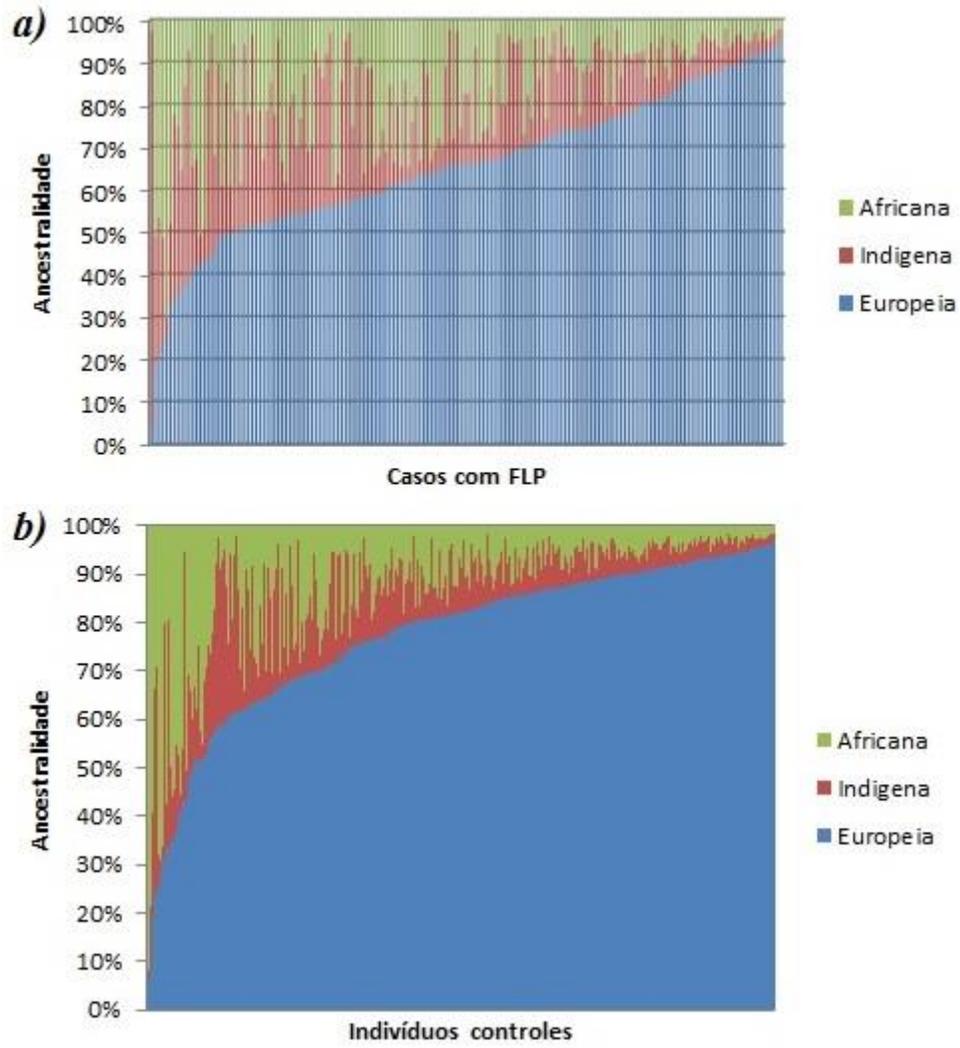


**Figura 13.** A) Resultados da análise da frequência do menor alelo (MAF). B) Resultados da análise de equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Tendo em vista que os SNPs utilizados para avaliar a associação entre FLP isolada e o gene *TBX22* não estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, este foi excluído da análise de associação.

## **2. Estimativa da estratificação da amostra**

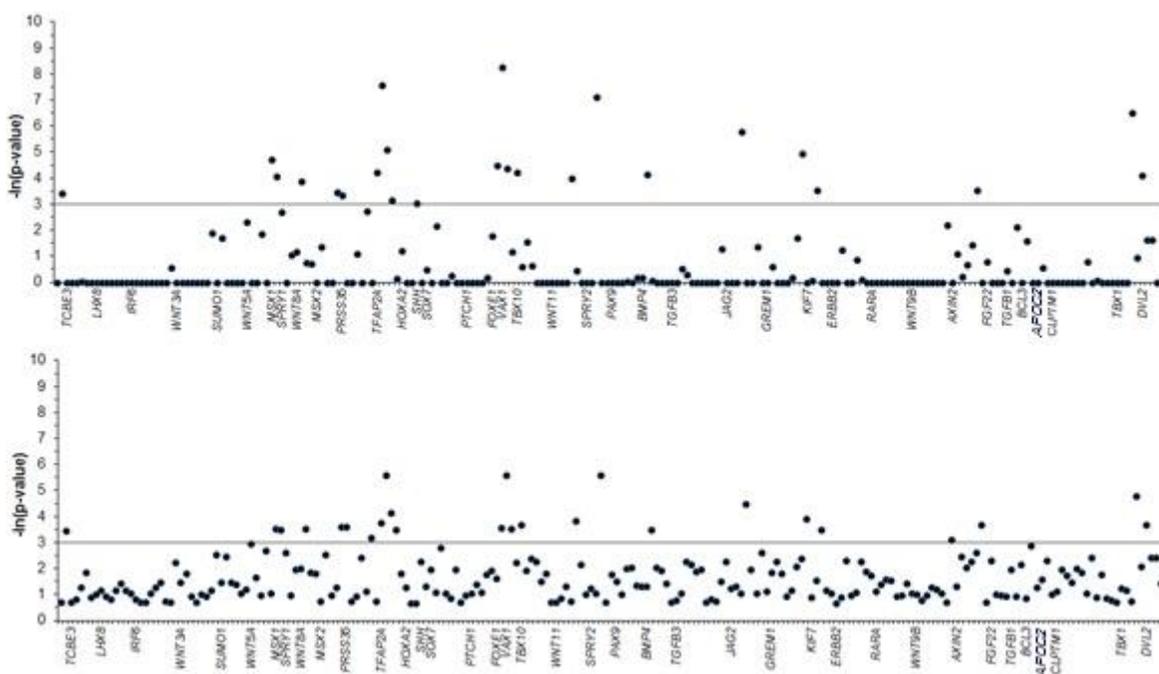
As contribuições médias de descendência foram estimadas em 65,7% Europeia, 16,6% Africana, e 17,7% Indígena no grupo controle. Já no grupo de casos, foram 77,2% Europeia, 12,5% Africana e 10,3% Indígena. Além disso, o valor de  $F_{st}$  foi de 0,00483. Desse modo, não houve diferenças estatísticas significativas nas proporções de ancestralidade entre os grupos (Figura 14), permitindo a realização de estudo de associação do tipo caso-controle.



**Figura 14.** Gráficos mostrando a ancestralidade de cada indivíduo no grupo de casos com FLP (a) e no grupo controle (b).

### 3. Resultados de associação genética

Foi analisada a associação entre 251 SNPs em 38 genes e FLP isolada (Figura 15). Depois dos dados serem ajustados para múltiplos testes pela correção de *Bonferroni* e pela segunda correção de FDR, foi encontrada associação entre 16 genes e FLP isolada (Tabela 3).



**Figura 15.** Resultados da análise de regressão logística, onde cada ponto representa um SNP. Os SNPs acima da linha cheia ( $-\ln(p\text{-value}) > 3,00$ ), indicam os SNPs com associação genética estatisticamente significativa para o fenótipo. Gráfico A - baseado na análise por Bonferroni, e gráfico B - baseado na análise por FDR.

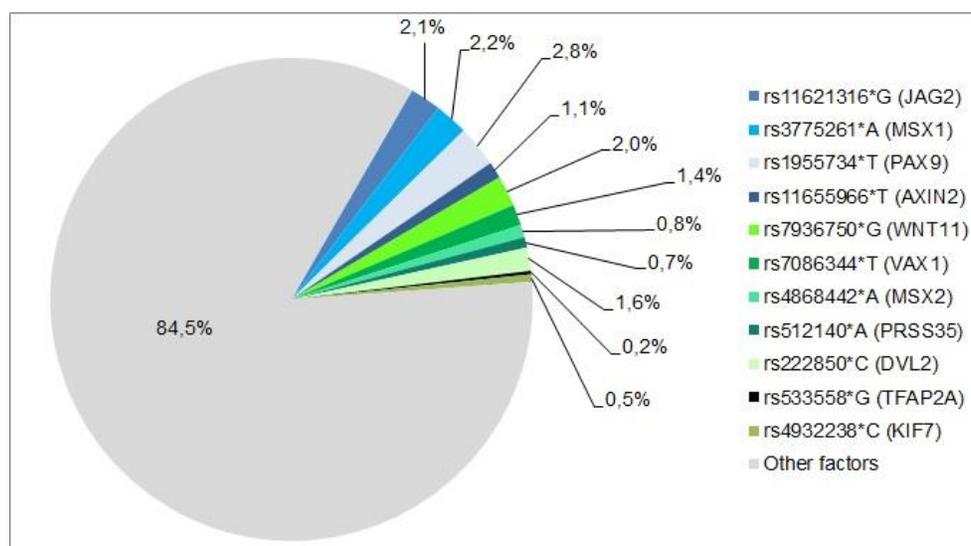
**Tabela 3.** Resultados da análise de regressão logística e característica dos SNPs associados com FLP isolada nesse estudo.

SNP	Cromossomo	Gene	Função do SNP*	Alelo	P corrigido	OR (IC)	MAF
rs2235541	1	<i>TCEB3</i>	Sentido trocado	T	0,032	1,65 (1,15-2,37)	0,135
rs3775261	4	<i>MSX1</i>	Intron	A	0,009	1,48 (1,13 -1,94)	0,348
rs300566	4	<i>SPRY1</i>	Intron	A	0,017	1,59 (1,14 – 2,21)	0,191
rs4868442	5	<i>MSX2</i>	Intron	A	0,02	0,69 (0,53-0,89)	0,411
rs4706180	6	<i>PRSS35</i>	Intron	C	0,032	1,55 (1,16 -2,08)	0,245
rs512140	6	<i>PRSS35</i>	Intron	A	0,035	0,64 (0,48 -0,86)	0,267
rs537112	6	<i>TFAP2A</i>	Intron	T	0,015	1,72 (1,22 – 2,43)	0,142
rs533558	6	<i>TFAP2A</i>	Intron	G	0,001	1,72 (1,32 – 2,25)	0,482
rs303048	6	<i>TFAP2A</i>	Intron	T	0,006	1,59 (1,21 – 2,09)	0,296
rs1675414	6	<i>TFAP2A</i>	Intron	C	0,042	0,68 (0,52 – 0,9)	0,363
rs1233556	7	<i>SHH</i>	Intron	T	0,047	1,37 (1- 1,87)	0,188
rs10787760	10	<i>VAX1</i>	Variante 3'UTR	G	0,011	1,5 (1,14 -1,97)	0,364
rs7086344	10	<i>VAX1</i>	Variante 3'UTR	T	0	1,9 (1,38-2,62)	0,19
rs6585429	10	<i>VAX1</i>	Intron	A	0,013	1,52 (1,14- 2,02)	0,271
rs3758938	11	<i>TBX10</i>	Sentido trocado	G	0,015	1,57 (1,17-2,1)	0,29
rs7936750	11	<i>WNT11</i>	Intron	G	0,018	2,43 (1,4 -4,21)	0,053
rs1955734	14	<i>PAX9</i>	Intron	T	0,001	1,68 (1,31-2,17)	0,48
rs17563	14	<i>BMP4</i>	Sentido trocado	C	0,016	0,7 (0,54-0,9)	0,456
rs11621316	14	<i>JAG2</i>	Intron	G	0,003	0,62 (0,48-0,81)	0,462
rs4932238	15	<i>KIF7</i>	Intron	C	0,007	1,76 (1,24-2,48)	0,165
rs4932240	15	<i>KIF7</i>	Intron	T	0,029	1,59 (1,14-2,2)	0,191
rs11655966	17	<i>AXIN2</i>	Intron	T	0,03	1,5 (1,15-1,96)	0,331
rs2074222	17	<i>DVL2</i>	Intron	G	0,002	0,48 (0,33-0,71)	0,406
rs222850	17	<i>DVL2</i>	Intron	C	0,016	0,57 (0,4-0,82)	0,316

Legenda: \*De acordo com *Single Nucleotide Polymorphism* database (dbSNP), MAF: frequência do menor alelo de acordo com os controles, OR = *Odds ratio*, IC = intervalo de confiança, 3'UTR= 3' *Untranslated region*.

Apesar de os SNPs selecionados terem como objetivo o rastreamento dos genes selecionados para esse estudo, todos os SNPs presentes em regiões intrônicas foram pesquisados em bases de dados (dbSNP) em busca de possível relação causal com FLP isolada e nenhuma relação foi encontrada.

A análise de regressão *stepwise* mostrou que 11 SNPs em 11 genes (*PAX9*, *MSX1*, *JAG2*, *WNT11*, *DVL2*, *VAX1*, *AXIN2*, *PRSS35*, *MSX2*, *KIF7* e *TFAP2A*) que foram associados nesse estudo correspondem, juntos, a 15,5% dos fatores envolvidos na etiologia de FLP isolada nessa amostra. Cinco genes (*BMP4*, *SHH*, *SPRY1*, *TBX10* e *TCEB3*) apresentaram uma baixa porcentagem nesta análise e não estão representados na Figura 16.



**Figura 16.** Resultado da análise de regressão *stepwise*.

Não foi encontrada associação entre FLP isolada e 22 genes (*APOC2*, *BCL3*, *CLPTM1*, *ERBB2*, *FGF22*, *FOXE1*, *HOXA2*, *IRF6*, *LHX8*, *GREM1*, *PTCH1*, *RARA*, *SOX7*, *SPRY2*, *SUMO1*, *TBX1*, *TGFB1*, *TGFB3*, *WNT3A*, *WNT5A*, *WNT8A* e *WNT9B*).

#### 4. Análise de predição de mutações *in silico*

Três dos SNPs associados com FLP neste estudo são mutações de sentido trocado. Um algoritmo computacional foi, portanto, aplicado para avaliar seus efeitos sobre a função da proteína. Estes resultados são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados dos algoritmos PolyPhen-2 e SIFT para três SNPs associados à FLP na presente amostra.

<b>SNP (Gene)</b>	<b>Efeito na proteína</b>	<b>PolyPhen-2</b>	<b>SIFT</b>
<b>rs17563 (<i>BMP4</i>)</b>	p.V52A	Benigno (Escore=0.002, sensibilidade: 0.99; especificidade: 0.30)	Tolerada (Escore=0.42)
<b>rs3758938 (<i>TBX10</i>)</b>	p.K101T	Provavelmente Prejudicial (Escore=0.999; sensibilidade: 0.14; especificidade: 0.99)	Prejudicial (Escore=0.01)
<b>rs2235541 (<i>TCEB3</i>)</b>	p.T145M	Provavelmente Prejudicial (Escore=0.968; sensibilidade: 0.77; especificidade: 0.95)	Prejudicial (Escore=0.03)



## *DISCUSSÃO*

Embora as FLP isoladas estejam entre os defeitos congênitos mais comuns, a complexidade dos eventos genéticos e ambientais associados à sua patogênese representa um enorme desafio para a caracterização etiológica deste grupo de doenças. Identificar as alterações genéticas pode ter um impacto no aconselhamento genético e melhorar a compreensão sobre o desenvolvimento craniofacial. Certas características deste estudo devem ser destacadas: a) a homogeneidade fenotípica dos casos; b) a ausência de fendas orais em três gerações no grupo controle; e c) a não estratificação da amostra estudada, o que é importante quando se analisa uma amostra miscigenada, tal como a população brasileira.

Em vários estudos anteriores, foi investigada a associação de genes com fenda de lábio com ou sem fenda de palato isolada, analisando FL junto com FLP no mesmo grupo. Há evidências que sugerem que FL e FLP podem ser entidades separadas, com diferentes etiologias e patogênese (232-234). No presente estudo, a amostra apresentou maior homogeneidade fenotípica, uma vez que foram incluídos apenas pacientes que apresentaram FLP isolada.

A estratificação da população é uma grande preocupação em estudos de associação de populações miscigenadas (235). Em estudos de associação é necessário avaliar o nível de estratificação populacional e nesse estudo descobriu-se que os dois grupos tinham estruturas genéticas semelhantes, o que permitiu realizar uma análise de associação genética imparcial.

Entre os 39 genes analisados, 16 foram associados com FLP isolada, incluindo dois novos genes, *TCEB3* e *KIF7*, ambos propostos recentemente (202). É importante ressaltar que a análise de regressão *stepwise* revelou que 15,5% da etiologia de FLP isolada poderia ser explicada por 11 genes: *VAX1*, *PRSS35*, *WNT11*, *AXIN2*, *DVL2*, *PAX9*, *MSX1*, *MSX2*, *JAG2*, *TFAP2A* e *KIF7*. Estes dados apoiam a conclusão de que parte da contribuição genética em FLP isolada na população brasileira, que é claramente miscigenada, é diferente de estudos anteriores (38). Embora 84,5% da etiologia do fenótipo global de FLP permaneça incerto, esta pode, provavelmente, ser atribuída a fatores ambientais ou a genes desconhecidos adicionais ou, ainda, a interações desses dois últimos.

O gene *VAX1* codifica o fator de transcrição homeodominio *ventral anterior homeobox 1*. A evidência a partir de modelos animais sugerem que *Vax1* tem funções biológicas na região craniofacial (236). Três SNPs (rs10787760\*G, rs7086344\*T e rs6585429\*A) na região 3'UTR do gene *VAX1* foram associados com um risco aumentado de FLP isolada nesta amostra da população brasileira, o que está de acordo com estudos anteriores (145,147, 237).

Dois SNPs na região intrônica do gene *PRSS35* foram associados com um risco aumentado de ocorrência de FLP isolada (rs512140 e rs4706180). Letra et al. (203) também relataram uma associação entre o gene *PRSS35* SNPs (rs7753918, rs1171114 e rs512140) com fenda de lábio com ou sem fenda de palato em um estudo de caso-controle que incluiu famílias brasileiras, chinesas e caucasianas. Além disso, o gene *Prss35* é expresso na cabeça e no palato de embriões de camundongos durante as fases críticas da palatogênese (203).

A via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina é um componente chave no desenvolvimento da cabeça e da face em embriões de camundongos (238, 239). Um SNP

(rs7936750) em uma região intrônica de *WNT11* (*wingless-type MMTV integration site family, member 11*) foi associado a um risco aumentado de FLP isolada. Outros genes *WNT* (*WNT3*, *WNT3A* - *wingless-type MMTV integration site family, member 3A*, *WNT5A* - *wingless-type MMTV integration site family, member 5A*, *WNT9A* - *wingless-type MMTV integration site family, member 9A*, *WNT11*) têm sido associados com fenda de lábio com ou sem fenda de palato isolada em várias populações (173), apoiando ainda mais a função dos genes da família *WNT* na etiologia das fendas orais.

Por sua vez, o gene *AXIN2* regula negativamente a via de sinalização *WNT*, participando na degradação de  $\beta$ -catenina na ausência de ligantes *WNT*. Esta proteína desempenha uma função crítica na condução de células ao seu destino durante a morfogênese craniofacial (240). Além disso, um estudo anterior relatou uma associação de mutações germinativas em *AXIN2* com agenesia dentária familiar e esporádica (241). *Axin2* mRNA e expressão da proteína foi detectada em toda a palatogênese de camundogos (242). Neste estudo, encontrou-se um SNP (rs11655966) na região intrônica do gene *AXIN2* associada com um risco aumentado de FLP isolada. Letra et al. (242) também observaram uma associação entre este SNP e fenda de lábio com ou sem fenda de palato. SNPs em *AXIN2* também têm sido associados com fenda de lábio com ou sem fenda de palato em outros estudos de caso-controle (242, 243).

O gene *DVL2* (*dishevelled segment polarity protein 2*) codifica uma das três isoformas *DVL* que desempenham um papel crucial na sinalização *Wnt*/ $\beta$ -catenina. No presente estudo, dois SNPs (rs2074222 e rs222850) em regiões intrônicas do gene *DVL2* foram associados com um risco aumentado de FLP isolada. Mostowska et al. (244) também encontraram três variantes *DVL2* (rs35594616, rs2074222, e rs222836) que foram

significativamente associadas ao aumento do risco de fenda de lábio com ou sem fenda de palato.

Os genes *Paired box* (PAX) codificam fatores de transcrição específicos de ligação ao DNA que desempenham funções críticas durante o desenvolvimento embrionário. Vários estudos têm encontrado associação entre os genes PAX e fenda de lábio com ou sem fenda de palato em animais. Foi encontrado na presente amostra um SNP (rs1955734) na região intrônica do gene *PAX9* que foi associado com um risco aumentado de FLP isolada. Mutações no gene *PAX9* em seres humanos causam hipodontia molar, freqüentemente em associação com fenda de lábio com ou sem fenda de palato (154). Ichikawa et al. (225) encontraram uma mutação de sentido trocado heterozigótica em um *exon* do gene *PAX9* em dois irmãos japoneses com fenda de lábio com ou sem fenda de palato e sua mãe fenotipicamente normal.

O gene *TBX10* é um membro da família de genes T-box que codificam fatores de transcrição de ligação ao DNA. Os membros desta família são conhecidos por desempenharem funções essenciais nas estruturas da mesoderme (245). Além disso, este gene tem sido fortemente associado com o gene *TBX22*, um gene conhecido por causar apenas FP (125,128). Encontramos uma variante de sentido trocado, SNP rs3758938 no gene *TBX10*, associada com um risco aumentado de FLP isolada. Os algoritmos computacionais PolyPhen-2 e SIFT indicaram um efeito prejudicial deste SNP. Esses dados corroboram a hipótese de uma associação entre este gene e FLP isolada.

Os genes *muscle segment homeobox 1 e 2* (*MSX1 e MSX2*) codificam fatores de transcrição que exercem funções críticas no desenvolvimento craniofacial e surgiram como fortes genes candidatos para fenda de lábio com ou sem fenda de palato por meio de estudos

de associação em várias populações (38,125,152,246). O presente estudo detectou associações entre *MSX1* SNP rs3775261 e um risco aumentado de FLP isolada; e *MSX2* SNP rs4868442 e uma diminuição do risco de FLP isolada nesta amostra. O sequenciamento completo do gene *MSX1* em seres humanos revelou várias novas mutações que parecem contribuir para cerca de 2% dos casos de fenda de lábio com ou sem fenda de palato isolada (143,247). Este resultado é semelhante ao efeito encontrado neste estudo para o SNP rs3775261, o qual contribui em 2,2% do fenótipo de FLP isolada. Camundongos *Msx1* exibem FP e anomalias craniofaciais e dentárias, enquanto que o lábio e outras estruturas orais não se desenvolvem em camundongos duplo nocaute *Msx1/Msx2* (248).

O gene *JAG2* codifica um ligando para a família de receptores transmembranares Notch, que estão envolvidos na sinalização de um mecanismo essencial necessário para o desenvolvimento normal do palato (149). Um SNP (rs11621316) em uma região intrônica do gene *JAG2* foi associado a um risco aumentado de FLP isolada. Outros estudos de associação indicaram envolvimento do gene *JAG2* em fenda de lábio com ou sem fenda de palato (125). Também tem sido demonstrado que a função dos genes *IRF6* e *JAG2* estão em vias moleculares convergentes durante a diferenciação epitelial oral e que esta sinalização integrada é essencial para o controle de adesão palatina e a competência de sua fusão (151).

O gene *BMP4* é um membro da proteína morfogenética óssea (BMP) e da família *TGFB*, ambas as quais cumprem papéis essenciais no desenvolvimento embrionário. Evidências experimentais indicaram que o gene *Bmp4* estava envolvido na etiologia de fenda de lábio com ou sem fenda de palato em camundongos (83). Além disso, foi encontrada uma associação entre o gene *BMP4* e fenda de lábio com ou sem fenda de palato em seres

humanos de diferentes grupos étnicos (249, 250, 251, 252). Um estudo anterior da população brasileira encontrou uma associação entre fenda de lábio com ou sem fenda de palato e o SNP rs17563 no gene *BMP4*, bem como observou um efeito protetor contra a ocorrência de fenda de lábio com ou sem fenda de palato conferida pelo alelo C desta variante (253). No presente estudo, esta associação foi confirmada em uma amostra maior. Além disso, os testes PolyPhen-2 e SIFT indicaram o caráter benigno e tolerante deste SNP.

O gene *TFAP2A* é expresso em estruturas craniofaciais (121). Shi et al. (201) verificaram que uma grande deleção incluiu o gene *TFAP2A* em um paciente com FL. Associações entre quatro SNPs (rs537112, rs533558, rs303048 e rs1675414) no gene *TFAP2A* e FLP isolada foram detectadas no presente estudo. Além disso, as mutações no gene *TFAP2A* têm sido relatadas na síndrome brânquio-óculo-facial, que inclui fenda oral como parte do fenótipo (123).

O gene *SHH* é o principal membro da família *hedgehog*; esta regula eventos fundamentais de desenvolvimento durante a embriogênese e tem sido associada com o desenvolvimento anormal dos dentes e orofacial. Além disso, o gene *SHH* é expresso na ectoderme dos processos frontonasais e maxilares (254). Nesta amostra, o *SHH* SNP rs1233556 foi associado a um risco aumentado de FLP isolada. Mutações no gene *SHH* resultam em holoprosencefalia, demonstrando a função essencial deste fator de crescimento no desenvolvimento da face (100).

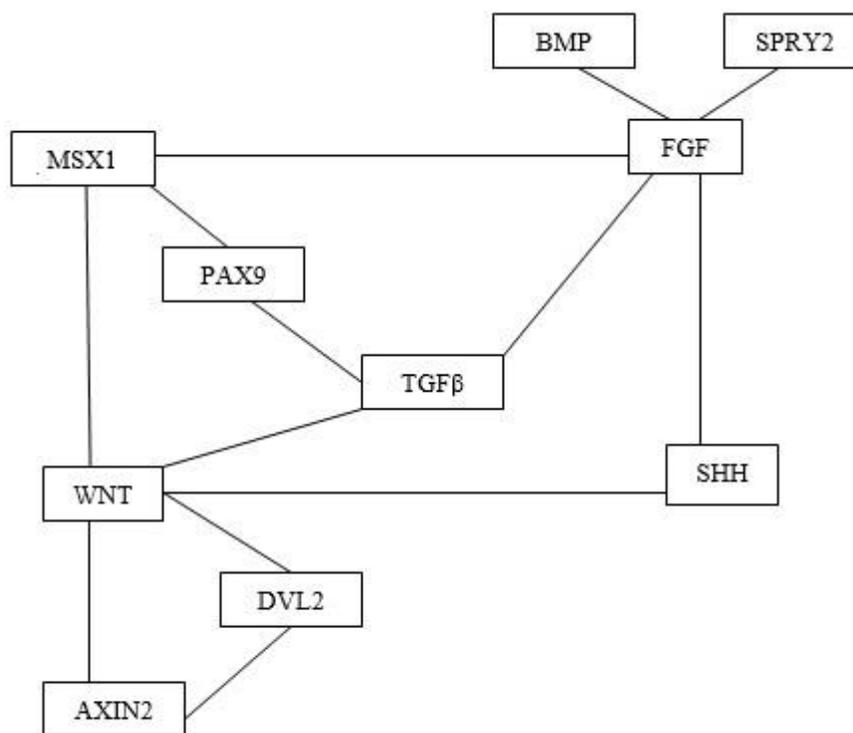
Um SNP (rs300566) numa região intrônica do gene *SPRY1* foi associado a um risco aumentado de FLP isolada nesta pesquisa. Nos vertebrados, existem quatro proteínas *Sprouty* que tanto inibem ou potencializam a sinalização do receptor de tirosina quinase de uma forma específica. Durante o desenvolvimento dos vertebrados, proteínas *Spry* exibem

padrões de sobreposição de expressão, particularmente em estruturas craniofaciais e membros. Estudos de genes alvo revelaram ambas funções distintas e redundantes para proteínas Spry durante o desenvolvimento (255).

O gene *KIF7* (rs4932238, rs4932240) também foi associado a um risco aumentado de FLP isolada neste estudo. Esta é a primeira vez que este gene é associado com a o fenótipo de FLP isolada. Putoux et al. (256) encontraram mutações no gene *KIF7* em pacientes com síndrome acrocallosal. Esta síndrome é uma doença recessiva rara caracterizada pela agenesia ou hipoplasia do corpo caloso, dismorfismo craniofacial, duplicação do hálux, polidactilia pós-axial e retardo mental grave. O gene *KIF7* é um componente chave da via SHH e codifica uma proteína associada a cílios que pertence à família cinesina que desempenha um papel importante na transdução de sinal de SHH (257).

O presente estudo é o primeiro a encontrar uma associação entre o gene *TCEB3* (mutação de sentido trocado - rs2235541) com um risco aumentado de FLP isolada. Os resultados dos teste *in silico* PolyPhen-2 e SIFT mostraram o carácter prejudicial desta mutação, fundamentando uma associação entre este gene e FLP isolada. Esta potencial associação foi descrita inicialmente baseada em um estudo do número de cópias em indivíduos com fenda de lábio com ou sem fenda de palato (202). Este gene 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 (258). Estudos protéicos evidenciam a interação entre as proteínas de alongação B e C com domínios de ligação do tipo SPRY (259).

A maioria dos genes associados com FLP isolada neste estudo possuem vias correlacionadas. Os fatores de crescimento envolvidos no desenvolvimento orofacial pertencem principalmente a quatro famílias: FGF, HH, TGF- $\beta$ , que inclui as BMPs e activinas, e WNT (Figura 17).



**Figura 17.** Esquema de articulação entre vários genes envolvidos na etiologia de FLP.

A expressão da via WNT muitas vezes coincide com a expressão da via HH e ligantes da família TGF- $\beta$  (107). Os ligantes WNT atuam através de receptores específicos da superfície celular (Frizzled 1-10) para ativar uma via de transdução de sinal intracelular que, em seguida, ativa a proteína citoplasmática Disheveled (DVL) (106). Após estimulação de WNT, DVL recruta AXIN (*axis inhibition protein*) para a membrana plasmática, onde DVL promove a fosforilação do co-receptor *LRP6* (*low density lipoprotein receptor-related*

*protein 6*) (260). Esta última molécula é um inibidor competitivo direto de *GSK3β* (*glycogen synthase kinase 3 beta*), que permite β-catenina acumular-se e operar como uma chave de transcrição no núcleo (261). O *Knockdown* de *Dvl1* [*dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)*], *Dvl2* [*dishevelled 2, dsh homolog (Drosophila)*], ou *Dvl3* [*dishevelled 3, dsh homolog (Drosophila)*] pode atenuar a capacidade de *Wnt3a* para estimular a via Wnt/β-catenina (262). A deficiência de *Wnt5a* leva a fenda de palato secundário completo.

A expressão alterada dos genes *Bmp4*, *Shh* e *Msx1* foi observada no palato de camundongos *Wnt5a* mutantes (263). O WNT3 é o ligante que se liga a LRP6 para controlar o desenvolvimento de lábio. Por sua vez, o LRP6 é um mediador chave necessária para ativar a via canônica Wnt/β-catenina (238). Os camundongos deficientes de *Lrp6* exibem FLP e defeitos mandibulares (238, 264). Mais importante, foi sugerido que a sub-regulação local de ambos os genes *Msx1* e *Msx2* no mesênquima do primórdio orofacial poderia ser uma das principais causas de FLP em mutantes *Lrp6* (238).

As interações entre *BMPs* e *MSX1* são importantes no desenvolvimento orofacial, sendo que o gene *Msx1* é necessário para a expressão dos genes *Bmp4* e *Bmp2* no mesênquima palatal e para a expressão do gene *Shh* no epitélio da borda média em camundongos (30,83,265). A expressão transgênica de *Bmp4* no mesênquima palatal do camundongo *Msx1*<sup>-/-</sup> mutante apresenta o fenótipo de FP. A ligação entre *Bmp4* e *Msx1* é particularmente notável na medida em que os camundongos que não têm *Msx1* exibem FP e anomalias crânio faciais e no desenvolvimento dos dentes (266).

Deve-se observar que todo estudo de associação genética tem limitações, pois utiliza apenas variantes comuns (frequência acima de 5%) e portanto não detecta variantes raras (frequência entre 0,1% a 3%) (267). Desse modo, os genes que não foram associados

à FLP podem possuir variantes raras que estejam associadas com o fenótipo de FLP isolada. Uma alternativa nesses casos é o uso de outras técnicas com o sequenciamento de alto desempenho (*Next Generation Sequencing*).

Vários genes comumente associados com fendas orais, tais como *IRF6*, não foram associados, neste estudo, com FLP isolada. O gene *IRF6* tem sido frequentemente estudado e mostrou-se associado com fenda oral (117,268,269). Zuccherro et al. (119) sugeriram que *IRF6* poderia contribuir com 12% dos casos de fendas orais, incluindo todos os tipos. Estes estudos anteriores encontraram associação entre o polimorfismo p.V274I (rs2235371) e fenda de lábio com ou sem fenda de palato (269,270). O programa *SNPbrowser* 4.0 (*Applied Biosystems*) selecionou os SNPs para rastreamento do gene baseado em segregação, o que é fundamental em estudo do tipo caso-controle. Por este método a variante rs2235371 do gene *IRF6* analisada anteriormente por Letra et al. (2012) e Li et al. (2012) não foi incluída para análise.

Além disso, a ausência de uma associação entre fendas orais e o gene *IRF6* na amostra da presente pesquisa pode ser devido ao fato de que foram incluídos nesse estudo especificamente casos com FLP isolada, em contraste com outros estudos que normalmente agrupam vários tipos de fendas orais. Outra explicação é que as interações entre fatores genéticos e ambientais podem afetar várias populações de forma diferente. É provável que o gene *IRF6* não seja um forte fator de risco para FLP na população brasileira, ou pode fazer contribuições específicas para um outro tipo de fenda oral, como por exemplo, FL (271).

Os resultados deste estudo sugerem que a associação de variantes de sequência de 16 genes podem interromper a formação e/ou de fusão dos processos faciais e predispor indivíduos a FLP isolada. A maioria dos SNPs associados com FLP isolada neste estudo

estão localizados em regiões intrônicas dos genes estudados. Uma vez que estes SNPs não alteram a sequência da proteína, o desequilíbrio de ligação com uma mutação funcional ou alterações traducionais devem ser considerados, dado que ambas estas possibilidades iriam afetar a função proteica. Como este foi um estudo de associação indireto, os SNPs associados apontam regiões onde podem haver variantes causais, ou seja, são *hotspots*, cujos genes devem ser melhores investigados para encontrá-las.

Nesse estudo foi possível determinar alguns genes que estão associados à etiologia de FLP isolada na população brasileira por meio de SNPs. Deve-se destacar as novas associações encontradas entre os genes *KIF7* e *TCEB3* e o risco de FLP isolada. As novas abordagens tecnológicas utilizando o mesmo desenho da amostra deverão ajudar a identificar as variantes de susceptibilidade etiológica.



## CONCLUSÕES

Nesta amostra conclui-se que:

1. Os genes *MSX1*, *SPRY1*, *MSX2*, *PRSS35*, *TFAP2A*, *SHH*, *VAX1*, *TBX10*, *WNT11*, *PAX9*, *BMP4*, *JAG2*, *AXIN2*, *DVL2*, *KIF7* e *TCBE3* foram associados à FLP isolada.
2. Os genes *APOC2*, *BCL3*, *CLPTM1*, *ERBB2*, *FGF22*, *FOXE1*, *HOXA2*, *IRF6*, *LHX8*, *GREM1*, *PTCH1*, *RARA*, *SOX7*, *SPRY2*, *SUMO1*, *TBX1*, *TGFB1*, *TGFB3*, *WNT3A*, *WNT5A*, *WNT8A*, *WNT9B* não foram associados à FLP isolada.
3. Não foi possível investigar a associação entre o gene *TBX22* e FLP isolada.



## ***REFERÊNCIAS***

1. Silva Filho OG, Ferrari Júnior FM, Rocha DL, Freitas JAS. Classificação das fissuras lábio-palatais: breve histórico, considerações clínicas e sugestão de modificação. *Rev Bras Cir.* 1992; 82(2):59-65.
2. Tolarová MM, Cervenka J. Classification and Birth Prevalence of Orofacial Clefts. *Am J Med Genet.* 1998; 75:126-37.
3. Marazita, ML. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012; 13:263-83.
4. Grosen D, Chevrier C, Skytthe A, Bille C, Mølsted K, Sivertsen A et al. A cohort study of recurrence patterns among more than 54,000 relatives of oral cleft cases in Denmark: support for the multifactorial threshold model of inheritance. *J Med Genet.* 2010; 47(3):162-8.
5. Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M et al., Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet.* 2008; 40(11):1341-7.
6. Ludwig KU, Mangold E, Herms S, Nowak S, Reutter H, Paul A et al. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nat Genet.* 2012; 44(9):968-71.
7. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011; 12:167-78.
8. Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet.* 2009; 374(9703): 1773-85.

9. 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.
10. IPDTC Working Group. Prevalence at birth of cleft lip with or without cleft palate: CAR data from the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTC). *Cleft Palate Craniofac J*. 2011; 48(1):66-81.
11. Rice DPC. Craniofacial Anomalies: From Development to Molecular Pathogenesis. *Current Molecular Medicine*. 2005; 5:699-722.
12. Cobourne, MT. The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod*. 2004; 26:7-16.
13. Calzolari E, Pierini A, Astolfi G, Bianchi F, Neville AJ, Rivieri F. Associated anomalies in multi-malformed infants with cleft lip and palate: an epidemiologic study of nearly 6 million births in 23 EUROCAT registries. *Am J Med Genet A*. 2007; 143:528-37.
14. Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet*. 1999; 8:1853-59.
15. Eppley BL, Van Aalst JA, Robey A, Havlik RJ, Sadove AM. The spectrum of orofacial clefting. *Plast Reconstr Surg*. 2005; 7:110e-4e.
16. Mitchell LE, Risch N. Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis. *Am J Hum Genet*. 1992; 51:323-32.
17. Sivertsen A, Wilcox AJ, Skjaerven R, Vindenes HA, Abyholm F, Harville E et al. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population-based cohort study of first degree relatives. *BMJ*. 2008; 336:432-4.

18. Mitchell, LE. Cleft lip palate: from origin to treatment, Twin, Studies in Oral Cleft Research. USA: Oxford University Press; 2002
19. Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis.* 2009; 15:437-53.
20. Carstens, MH. Development of the facial midline. *J Craniofac Surg.* 2002; 13:129-87.
21. Gundlach KK, Maus C. Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world-wide. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006; 34:1-2.
22. World Health Organisation (WHO). Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies: report of WHO meetings on international collaborative research on craniofacial anomalies. *Cleft Palate Craniofac J.* 2004.41(3):238-43.
23. Tapadia MD, Cordero DR, Helms JA. It's all in your head: new insights into craniofacial development and deformation. *J Anat.* 2005; 207:461-77.
24. Garcia-Castro M, Bronner-Fraser M. Induction and differentiation of the neural crest. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11:695-8.
25. Cobourne, MT. Construction for the modern head, current concepts in craniofacial development. *J Orthod.* 2000; 27:307-14.
26. Wilkie AO, Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation. *Genetics.* 2001; 2:458-68.
27. Verwoerd DCA, Van Oostrom CG. Cephalic neural crest and placodes. *Adv Anat Embryol Exp Morphol.* 1978; 58:1-75

28. Sulik KK, Schoenwolf GC. Highlights of craniofacial morphogenesis in mammalian embryos as revealed by scanning electron microscopy. *Scanning Electron Microsc.* 1985; 4:1735-52
29. Sulik KK, Johnston MC. Embryonic origin of holoprosencephaly: interrelationship of the developing brain and face. *Scan Electron Microsc.* 1982; 1:309-22.
30. Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn.* 2006; 235:1152-66.
31. Sperber GH. Current concepts in embryonic craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992; 4(1):67-72.
32. Gritli-Linde, A. Molecular control of secondary palate development. *Dev Biol.* 2007; 301(2):309-26.
33. Ferguson, MW. Palate development. *Development.* 1988; 103: 41-60.
34. Cohen MM Jr. Malformations of the Craniofacial Region: Evolutionary, Embryonic, Genetic and Clinical Perspectives. *Am J Med Genet.* 2002; 115:245-68.
35. Marazita ML, Mooney MP. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. *Clin Plastic Surg.* 2004; 31:125-40.
36. Schliekelman P, Slatkin M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(6):1369-85.
37. Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15:270-278.
38. Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008; 87(2):119-25.

39. Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofacial Journal*. 2012; 49(1):73-91.
40. Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. 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. *Teratology*. 1999; 59 (1):39-50.
41. Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology*. 1996; 54(1):27-33.
42. Shaw GM, Lammer EJ. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts. *J Pediatr*. 1999; 134(3):298-303.
43. Natsume N, Kawai T, Ogi N, Yoshida W. Maternal risk factors in cleft lip and palate: case control study. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000; 38(1):23-5.
44. West JR, Blake CA. Fetal alcohol syndrome: an assessment of the field. *Exp Biol Med*. 2005; 230(6):354-356.
45. Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet*. 2002; 61(4):248-56.
46. Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR et al. Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. *PLoS ONE*. 2009; 4(4):e5385.
47. Boyles AL, DeRoo LA, Lie RT, Taylor JA, Jugessur A, Murray JC et al. Maternal alcohol consumption, alcohol metabolism genes, and the risk of oral clefts: a

- population-based case control study in Norway, 1996-2001. *Am J Epidemiol.* 2010; 172(8):924-931.
48. Shi M, Wehby GL, Murray JC. Review on genetic variants and maternal smoking in the etiology of oral clefts and other birth defects. *Birth Defects Research Part C Embryo Today.* 2008; 84(1):16-29.
49. van Rooij A, Wegerif MJ, Roelofs HM, Peters WH, Kuijpers-Jagtman AM, Zielhuis GA et al. Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environment interaction. *Epidemiology.* 2001; 12(5):502-7.
50. Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, Vander Kolk CA et al. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genet Epidemiol.* 2002; 22(1):1-11.
51. Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S. Nonsyndromic cleft lip and palate: complex genetics and environmental effects. *Ann Hum Genet.* 2001; 65:505-15.
52. Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F, Palmieri A, Marchesini J *et al.* Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat.* 2004; 24:104-5.
53. Chevrier C, Perret C, Bahuaud M, Zhu H, Nelva A, Herman C *et al.* Fetal and maternal MTHFR C677T genotype, maternal folate intake and the risk of nonsyndromic oral clefts. *Am J Med Genet A.* 2007; 143: 248-57.
54. Wehby GL, Murray JC. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Dis.* 2010; 16(1):11-19.

55. Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, Taylor J, McConnaughey DR, Abyholm F et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based casecontrol study. *BMJ (Clinical Research Edition)*. 2007; 334(7591):464.
56. Porter FD. Cholesterol precursors and facial clefting. *J Clin Invest*. 2006; 116(9):2322-5.
57. Munger RG, Tamura T, Johnston KE, Feldkamp ML, Pfister R, Carey JC. Plasma zinc concentrations of mothers and the risk of oral clefts in their children in Utah. *Birth Defects Research A Clin Mol Teratol*. 2009; 85(2):151–155.
58. Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol*. 2008; 37(5):1041-58.
59. Abbott BD. The etiology of cleft palate: a 50-year search for mechanistic and molecular understanding. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2010; 89(4):266-74.
60. Vieira AR. Genetic and environmental factors in human cleft lip and palate. *Front Oral Biol*. 2012;16:19-31
61. Lidral AC, Murray JC. Genetic approaches to identify disease genes for birth defects with cleft lip/palate as a model. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2004; 70: 893-901
62. Gorlin RJ, Cohen MMJr, Hennekam RCM. *Syndromes of the head and neck*,4th edition. New York:Oxford University Press. 2001.
63. Lidral AC, Moreno LM. Progress toward discerning the genetics of cleft lip. *Curr Opin Pediatr*. 2005; 17:731-9.

64. Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M, John N, Sommer L, Graf D et al. The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2011; 121(7-8):636-46.
65. Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet.* 2004; 1: R73-R81.
66. Wan M, Cao X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 328:651-7
67. Meng L, Bian Z, Torensma R, Von den Hoff JW. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J Dent Res.* 2009; 88:22-33.
68. Ito Y, Yeo JY, Chytil A, Han J, Bringas P Jr, Nakajima A et al. Conditional inactivation of *Tgfb2* in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development.* 2003; 130:5269-80
69. Wurdak H, Ittner L M, Lang K S, Leveen P, Suter U, Fischer J A, Karlsson S, Born W, Sommer L: Inactivation of TGFsignalling in neural crest stem cells leads to multiple defects reminiscent of DiGeorge syndrome. *Genes and Development.* 2005; 19:530-5
70. Li W-Y, Duddas M, Kaartinen V. Signaling through Tgf- $\beta$  type I receptor *Alk5* is required for upper lip fusion. *Mechanisms of Development.* 2008;125:874-82
71. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGFbeta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet.* 1995; 11:415-21.
72. Kaartinen V, Cui XM, Heisterkamp N, Groffen J, Shuler CF. Transforming growth factor-beta 3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal

- fusion and associated degradation of the basement membrane. *Developmental Dynamics*. 1997; 209: 255-60.
73. Nawshad A, LaGamba D, Hay ED. Transforming growth factor beta (TGFbeta) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Arch Oral Biol*. 2004; 49:675-89.
74. Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, Arcos-Burgos M, Cooper ME, Goldstein T et al. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet*. 2004; 75:161-73
75. Marazita ML, Neiswanger K Association studies. In: Wyszynski DFE, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment*. Oxford University Press: New York, NY, 2002; 240-54.
76. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal*. 2004; 16:291-9.
77. Greene RM, Pisano MM. Perspectives on growth factors and orofacial development. *Curr Pharm Des*. 2004; 10:2701-17.
78. Nie X, Luukko K, Kettunen P. BMP signalling in craniofacial development. *Int J Dev Biol*. 2006; 50:511-21.
79. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20:343-55.
80. Francis-West PH, Tatla T, Brickell P. Expression patterns of the bone morphogenetic protein genes Bmp-4 and Bmp-2 in the developing chick face suggest a role in outgrowth of the primordia. *Developmental Dynamics*. 1994; 201:168-78

81. Wu P, Jiang T-X, Suksaweang S, Widelitz R B, Chuong C-M. Molecular shaping of the beak. *Science*. 2004; 305:1465-6.
82. Ashique A M, Fu K, Richman J M: Endogenous bone morphogenetic proteins regulate outgrowth and epithelial survival during avian lip fusion. *Development* 2002; 129:4647-60
83. Liu W, Selever J, Murali Det al(2005a). Threshold-specific requirements for Bmp4 in mandibular development. *Dev Biol*283:282–293.
84. Liu W, Sun X, Braut Aet al(2005b). Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice.*Development* 132:1453–1461
85. Bachler M, Neubuser A (2001). Expression of members of the Fgf family and their receptors during midfacial development.*Mech Dev*100:313–316.
86. Kim HJ, Rice DPC, Kettunen PJ, Thesleff I FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development*. 1998; 125:1241-51.
87. Johnson D, Iseki S, Wilkie A, Morris-Kay GM. Expression patterns of Twist and Fgfr1, -2 and -3 in the developing mouse coronal suture suggest a key role for Twist in suture initiation and biogenesis. *Mech Dev*. 2000; 91:341-5.
88. Rice R, Spencer-Dene B, Connor E C, Gritli-Linde A, McMahon A P, Dickson C et al. Disruption of Fgf10/Fgfr2b-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. *J Clin Invest*. 2004; 113(12):1692-1700
89. 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: 4613-25.

90. Lee S, Crisera CA, Erfani S, Maldonado TS, Lee JJ, Alkasab SL et al. Immunolocalization of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in mouse palate development. *Plast Reconstr Surg.* 2001; 107:1776-84.
91. Pauws E, Stanier P. FGF signalling and SUMO modification: new players in the aetiology of cleft lip and/or palate. *Trends Genet.* 2007; 23:631-40.
92. Kreiborg S, Cohen MM: The oral manifestations of Apert syndrome. *Journal of craniofacial genetics and developmental biology.* 1992; 12(1):41-8.
93. Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Pape A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N et al. Loss of function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet.* 2003; 33:463-5
94. Kim HJ, Herrick S, Lemyre E, Kishikawa S, Salisz J, Seminara S et al. Hypogonadotropic hypogonadism and cleft lip and palate caused by a balanced translocation producing haploinsufficiency for FGFR1. *J Med Genet.* 2005; 42(8): 666-72.
95. Murray JC, Schutte BC. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest.* 2004; 113:1676-8.
96. Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM et al. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *PNAS.* 2007; 104: 4512-7.
97. Cohen MM Jr. An introduction to Sonic Hedgehog Signaling. In: Epstein CJ, Erickson RP, Wynshaw-Boris A, eds *Inborn errors of development.* Oxford University Press: New York. 2004; 210-28.

98. Jeong J, Mao J, Tenzen T, Kottmann AH, McMahon AP. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev.* 2004; 18:937-51.
99. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 1996; 383:407-13.
100. Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW et al. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet.* 1996; 14:357-60.
101. Mullor JL, Sanchez P, Ruiz i Altaba A. Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. *Trends Cell Biol.* 2002; 12:562-9.
102. Evans DG, Ladusans EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA. Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study. *J Med Genet.* 1993; 30:460-4.
103. Mansilla MA, Cooper ME, Goldstein T, Castilla EE, Lopez Camelo JS, Marazita ML et al. Contributions of PTCH gene variants to isolated cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac.* 2006; J43: 21-9.
104. Alappat SR, Zhang Z, Suzuki K, Zhang X, Liu H, Jiang R et al. The cellular and molecular etiology of the cleft secondary palate in Fgf10 mutant mice. *Dev Biol.* 2005; 277:102-13.
105. Sheldahl LC, Moon RT. Wnt signaling pathways. In: Epstein CJ, Erickson RP, Wynshaw-Boris A, eds *Inborn errors of development.* Oxford University Press: New York. 2004; 272-81.

106. Clevers H Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006; 127: 469-80.
107. Silva-Paiva KB, Silva-Valenzuela MDG, Gomes Massironi SM, Ko GM, Modolo-Siqueira F, Daumas-Nuñez F. Differential Shh, Bmp and Wnt gene expressions during craniofacial development in mice. *Acta Histochemica*. 2010; 112: 508-97.
108. Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L et al Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet*. 2004; 74:558-63.
109. Woods CG, Stricker S, Seemann P, Stern R, Cox J, Sherridan E et al Mutations in WNT7A cause a range of limb malformations, including Fuhrmann syndrome and Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia syndrome. *Am J Hum Genet* 2006; 79:402-8.
110. Juriloff DM, Harris MJ, McMahon AP, Carroll TJ, Lidral AC. Wnt9b is the mutated gene involved in multifactorial nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in A/WySn mice, as confirmed by a genetic complementation test. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2006; 76:574-9.
111. Sperber GH. Transitions in craniofacial biology: a tribute to Bernard G. Sarnat. *J Craniofac Surg*. 2012; 23(1):124-5.
112. Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet*. 2002; 32:285-9.

113. Ben J, Jabs EW, Chong SS. Genomic, cDNA and embryonic expression analysis of zebrafish IRF6, the gene mutated in the human oral clefting disorders Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Gene Expr Patterns*. 2005; 5:629-38.
114. Knight AS, Schutte BC, Jiang R, Dixon MJ. Developmental expression analysis of the mouse and chick orthologues of IRF6: the gene mutated in Van der Woude syndrome. *Dev Dyn*. 2006; 235:1441-7.
115. Washbourne BJ, Cox TC. Expression profiles of cIRF6, cLHX6 and cLHX7 in the facial primordia suggest specific roles during primary palatogenesis. *BMC Dev Biol*. 2006; 6:18.
116. Ingraham CR, Kinoshita A, Kondo S, Yang B, Sajan S, Trout KJ et al. Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). *Nat Genet*. 2006; 38:1335-40.
117. Jugessur A, Rahimov F, Lie RT, Wilcox AJ, Gjessing HK, Nilsen RM et al. Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotypebased analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway. *Genet Epidemiol* 2008; 32:413-24.
118. de Lima RL, Hoper SA, Ghassibe M, Cooper ME, Rorick NK, Kondo S, et al. Prevalence and nonrandom distribution of exonic mutations in interferon regulatory factor 6 in 307 families with Van der Woude syndrome and 37 families with popliteal pterygium syndrome. *Genet Med*. 2009; 11:241-7.
119. Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *New Engl J Med*. 2004; 351:769-80.

120. Little HJ, Rorick NK, Su LI, Baldock C, Malhotra S, Jowitt Tet al. Mis-sense mutations that cause Van der Woude syndrome and popliteal pterygium syndrome affect the DNA-binding and transcriptional activation functions of IRF6. *Hum Mol Genet.* 2008; 18:535-45.
121. Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ. Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature.* 1996; 381:235-238.
122. Nottoli T, Hagopian-Donaldson S, Zhang J, Perkins A, Williams T AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:13714-19
123. Milunsky JM, Maher TA, Zhao G, Roberts AE, Stalker HJ, Zori RT et al TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Hum Genet* 2008; 82:1171-7.
124. Brancaccio A, Minichiello A, Grachtchouk M, Antonini D, Sheng H, Parlato R et al. Requirement of the forkhead gene *Foxe1*, a target of sonic hedgehog signaling, in hair follicle morphogenesis. *Hum Mol Genet.* 2004; 13:2595-606.
125. Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F et al. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.* 2005; 1: e64
126. Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, Goldstein McHenry T et al. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered.* 2009; 68(3):151-70.

127. Braybrook C, Doudney K, Marcano AC, Arnason A, Bjornsson A, Patton MA et al. The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Nat Genet.* 2001; 29:179-83.
128. Marcano AC, Doudney K, Braybrook C, Squires R, Patton MA, Lees MM et al. TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate. *J Med Genet.* 2004; 41:68-74.
129. Suphapeetiporn K, Tongkobpetch S, Siriwan P, Shotelersuk V. TBX22 mutations are a frequent cause of nonsyndromic cleft palate in the Thai population. *Clin Genet.* 2007; 72: 478-83.
130. Braybrook C, Lisgo S, Doudney K, Henderson D, Marcano AC, Strachan T et al. Craniofacial expression of human and murine TBX22 correlates with the cleft palate and ankyloglossia phenotype observed in CPX patients. *Hum Mol Genet.* 2002; 11:2793-804.
131. Bush JO, Lan Y, Maltby KM, Jiang R. Isolation and developmental expression analysis of Tbx22, the mouse homolog of the human X-linked cleft palate gene. *Dev Dyn.* 2002; 225:322-6.
132. Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S et al. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet.* 2003; 362:1366-73.
133. Paylor R, Glaser B, Mupo A, Ataliotis P, Spencer C, Sobotka A et al. Tbx1 haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: implications for 22q11 deletion syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:7729-34.
134. Zweier C, Sticht H, Aydin-Yaylagul I, Campbell CE, Rauch A. Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions. *Am J Hum Genet.* 2007; 80:510-7.

135. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*. 2007; 370:1443-52.
136. Vieira TP, Monteiro FP, Sgardioli IC, Souza J, Fett-Conte AC, Monlleó IL et al. Clinical Features in Patients With 22q11.2 Deletion Syndrome Ascertained by Palatal Abnormalities. *Cleft Palate Craniofac J*. 2014.
137. Bush JO, Lan Y, Jiang R The cleft lip and palate defects in Dancer mutant mice result from gain of function of the Tbx10 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:7022-7.
138. Han J, Ishii M, Bringas P Jr, Maas RL, Maxson RE Jr, Chai Y. Concerted action of Msx1 and Msx2 in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development. *Mech Dev*. 2007; 124:729-45.
139. Alappat S, Zhang ZY, Chen YP. Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res*. 2003; 13:429-42.
140. van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet*. 2000; 24:342-43.
141. Nieminen P, Kotilainen J, Aalto Y, Knuutila S, Pirinen S, Thesleff I. MSX1 gene is deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome patients with oligodontia. *J Dent Res*. 2003; 82:1013-7.
142. Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD et al. Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol*. 2003; 24:230-9.

143. Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE et al. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2003; 40:399-407.
144. Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper ME et al. In a Vietnamese population. MSX1 variants contribute to cleft lip and palate, *Genet Med.* 2004; 6(3):117-25.
145. Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet.* 2010; 42:24-6.
146. Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet.* 2010; 42:525-9.
147. Butali A, Suzuki S, Cooper ME, Mansilla AM, Cuenco K, Leslie EJ et al. Replication of genome wide association identified candidate genes confirm the role of common and rare variants in PAX7 and VAX1 in the etiology of nonsyndromic CL(P). *Am J Med Genet Part A.* 2013; 161A:965-72
148. Hallonet M, Hollemann T, Pieler T, Gruss P. Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes Dev.* 1999; 13:3106-14.
149. 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; 235:1830-44.

150. Scapoli L, Martinelli M, Arlotti M, Palmieri A, Masiero E, Pezzetti F et al. Genes causing clefting syndromes as candidates for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: a family-based association study. *Eur J Oral Sci.* 2008; 116:507-11.
151. Richardson RJ, Dixon J, Jiang R, Dixon MJ. Integration of IRF6 and Jagged2 signalling is essential for controlling palatal adhesion and fusion competence. *Hum Mol Genet.* 2009;18:2632-42.
152. Jagomägi T, Nikopensius T, Krjutškov K, Tammekivi V, Viltrop T, Saag M et al. MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118:213-20.
153. Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* 1998; 12:2735-47.
154. Das P, Hai M, Elcock C, Leal SM, Brown DT, Brook AH et al. Novel missense mutations and a 288-bp exonic insertion in PAX9 in families with autosomal dominant hypodontia. *Am J Med Genet A.* 2003; 118:35-42
155. Su HL, Li SS Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene.* 2002; 296:65-73.
156. Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K et al. Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *Birt Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009; 85(1):42-51.
157. Blanco R, Suazo J, Santos JL, Paredes M, Sung H, Carreño H et al. Association between 10 microsatellite markers and nonsyndromic cleft lip palate in the Chilean population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2004; 41:163-7.

158. Fujita H, Nagata M, Ono K, Okubo H, Takagi R. Linkage analysis between BCL3 and nearby genes on 19q13.2 and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in multigenerational Japanese families. *Oral Dis* 2004; 10:353-9.
159. Yoshiura K, Machida J, Daack-Hirsch S, Patil SR, Ashworth LK, Hecht JT et al. Characterization of a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation t(2;19)(q11.2;q13.3) in a family with cleft lip and palate. *Genomics* 1998; 54:231-40.
160. Suzuki K, Hu D, Bustos T, Zlotogora J, Richieri-Costa A, Helms JA et al. Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nat Genet.* 2000; 25:427-30.
161. 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; 29:141-2.
162. Stein J, Mulliken JB, Stal S, Gasser DL, Malcolm S, Winter R et al. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families. *Am J Hum Genet.* 1995; 57:257-72
163. Wyszynski DF, Maestri N, McIntosh I, Smith EA, Lewanda AF, Garcia-Delgado C et al. 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; 99:22-6.
164. 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.

165. Shaw D, Ray A, Marazita M, Field L. Further evidence of a relationship between the retinoic acid receptor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (CLP). *Am J Hum Genet.* 1993; 53(5):1156-7.
166. 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.
167. 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.
168. Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynski DF et al. Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am. J Med Genet.* 1997; 73(3):337-44.
169. Kanno K, Suzuki Y, Yang X, Yamada A, Aoki Y, Kure S et al. Lack of evidence for a significant association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and the retinoic acid receptor alpha gene in the Japanese population. *J Hum Genet.* 2002; 47(6):269-74.
170. 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.
171. Lin W, Sanchez HB, Deerinck T, Morris JK, Ellisman M, Lee KF. Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(3):1299-304.

172. Lan Y, Ryan RC, Zhang Z, Bullard SA, Bush JO, Maltby KM et al. Expression of Wnt9b and activation of canonical Wnt signaling during midfacial morphogenesis in mice. *Dev Dyn.* 2006; 235:1448-54.
173. Chiquet BT, Blanton SH, Burt A, Ma D, Stal S, Mulliken JB et al. Variation in WNT genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mol Genet.* 2008; 17:2212-8.
174. Menezes R, Marazita ML, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Bardi K, Brandon C et al. AXIS inhibition protein 2 orofacial clefts and a family history of cancer. *J Am Dent Assoc.* 2009; 140:80-8.
175. Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I et al. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet.* 2004; 74:1043-50.
176. Kanzaki H, Ouchida M, Hanafusa H, Yano M, Suzuki H, Aoe M, et al. Single nucleotide polymorphism of the AXIN2 gene is preferentially associated with human lung cancer risk in a Japanese population. *Int J Mol Med.* 2006; 18:279-84.
177. Yook JI, Li XY, Ota I, Hu C, Kim HS, Kim NH et al. A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol.* 2006; 8(12):1398-406.
178. Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M et al. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2009; 41:473-7.

179. Juriloff DM Mapping studies in animal models. In: Wyszynski DF, ed. Cleft Lip and Palate: From Origin to Treatment. Oxford University Press: New York, NY, 2002; p. 265-82.
180. Brown NL, Knott L, Halligan E, Yarram SJ, Mansell JP, Sandy JR. Microarray analysis of murine palatogenesis: temporal expression of genes during normal palate development. *Dev Growth Differ.* 2003; 45:153-65.
181. Mukhopadhyay P, Greene RM, Zacharias W, Weinrich MC, Singh S, Young WW Jr et al. Developmental gene expression profiling of mammalian, fetal orofacial tissue. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004; 70:912-26.
182. Cai J, Ash D, Kotch LE, Jabs EW, Attie-Bitach T, Auge J et al. Gene expression in pharyngeal arch 1 during human embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:903-12.
183. Gong SG, Gong TW, Shum L. Identification of markers of the midface. *J Dent Res.* 2005; 84:69-72.
184. Juriloff DM, Harris MJ. Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008; 82:63-77.
185. Trasler DG. Pathogenesis of cleft lip and its relation to embryonic face shape in A-J and C57BL mice. *Teratology.* 1968; 1:33-49.
186. Diewert VM, Wang KY. Recent advances in primary palate and midface morphogenesis research. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992; 4:111-30.

187. Armit C, Venkataraman S, Richardson L, Stevenson P, Moss J, Graham L et al. eMouseAtlas, EMAGE, and the spatial dimension of the transcriptome. *Mamm Genome*. 2012
188. Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D. A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet*. 1998; 63:1153-9.
189. 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; 64:1702-8.
190. Osoegawa K, Vessere GM, Utami KH, Mansilla MA, Johnson MK, Riley BM et al. Identification of novel candidate genes associated with cleft lip and palate using array comparative genomic hybridisation. *J Med Genet*. 2008; 45(2):81-6.
191. 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.
192. Dundar M, Kiraz A, Tasdemir S, Akalin H, Kurtoglu S, Hafo F et al. Unbalanced 3;22 translocation with 22q11 and 3p deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A(11):2791-5.
193. Jelin A, Perry H, Hogue J, Oberoi S, Cotter PD, Klein OD. Clefting in trisomy 9p patients: genotype-phenotype correlation using microarray comparative genomic hybridization. *J Craniofac Surg*. 2010; 21(5):1376-9.

194. Chien SC, Li YC, Li LH, Wu JY, Hsu PC, Shi SL, Tsai FJ, Lin CC. A new familial insertion, ins(18;9)(q12.2;q33.1q31.1) with a 9q31.1-9q33.1 deletion in a girl with a cleft lip and palate. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A(7):1862-7.
195. Petrin A, Daack-Hirsch S, L'heureux J, Murray J. A case of 3q29 microdeletion syndrome involving oral cleft inherited from a non-affected mosaic parent: molecular analysis and ethical implications. *Cleft Palate Craniofac J*. 2010; 4.
196. Jakubiczka S, Schröder C, Ullmann R, Volleth M, Ledig S, Gilberg E et al. Translocation and deletion around SOX9 in a patient with acampomelic campomelic dysplasia and sex reversal. *Sex Dev*. 2010; 4(3):143-9.
197. Kimani JW, Yoshiura K, Shi M, Jugessur A, Moretti-Ferreira D, Christensen K, et al. Search for genomic alterations in monozygotic twins discordant for cleft lip and/or palate. *Twin Res Hum Genet*. 2009; 12(5): 462-8.
198. FitzPatrick DR, Carr IM, McLaren L, Leek JP, Wightman P, Williamson K et al. Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32-q33. *Hum Mol Genet*. 2003; 12(19):2491-501.
199. 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.
200. Machida J, Felix TM, Murray JC, Yoshiura K, Tanemura M, Kamamoto M et al. Searching for genes for cleft lip and/or palate based on breakpoint analysis of a balanced translocation t(9;17)(q32;q12). *Cleft Palate Craniofacial Journal*. 2009; 46(5):532-40.

201. Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K et al. Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *Birt Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009; 85(1):42-51.
202. Simioni M, Araujo TK, Monlleo IL, Maurer-Morelli CV, Gil-da-Silva-Lopes VL. Investigation of genetic factors underlying typical orofacial clefts: mutational screening and copy number variation. *J Hum Genet.* 2015; 60(1):17-25.
203. Letra A, Menezes R, Govil M, Fonseca RF, McHenry T, Granjeiro JM et al. Follow-up association studies of chromosome region 9q and nonsyndromic cleft lip/palate. *Am J Med Genet A.* 2010; 152A(7):1701-10.
204. Moreno LM, Mansilla MA, Bullard SA, Cooper ME, Busch TD, Machida J et al. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(24):4879-96.
205. Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature.* 2000, 405:847-56.
206. Young DL, Schneider RA, Hu D, Helms JA. Genetic and teratogenic approaches to craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Medical.* 2000; 11:304-17.
207. Ardingier 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 Genet.* 1989; 45:348-53.
208. Grant SF, Wang K, Zhang H, Glaberson W, Annaiah K, Kim CE et al. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr.* 2009; 155(6):909-13.

209. de Aquino SN, Messetti AC, Bagordakis E, Martelli-Júnior H, Swerts MS, Graner E et al. Polymorphisms in FGF12, VCL, CX43 and VAX1 in Brazilian patients with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *BMC Med Genet.* 2013; 14:53.
210. Menezes R, Letra A, Kim AH, Kúchler EC, Day A, Tannure PN et al. Studies with Wnt genes and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010; 88(11):995-1000.
211. Monlleó IL, Fontes MÍ, Ribeiro EM, de Souza J, Leal GF, Félix TM et al. Implementing the Brazilian database on orofacial clefts. *Plast Surg Int.* 2013; 64:1570.
212. International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research (ICBDSR). 2007. Annual Report 2007 (with data for 2005). Published by the Centre of the International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research, Rome, Italy; 2007.
213. Applied BioSystems. TaqMan® OpenArray™ Genotyping System – Getting Started Guide, 2010.
214. Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:2657-60.
215. Kutyavin IV, Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:3718-23.
216. Livak KJ, Marmaro J, Todd JA. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening [letter]. *Nat. Genet.* 1995; 9:341-2.

- 217.R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.
- 218.Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*. 2007; 39(2):175-91.
- 219.Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos AKC, Pereira R, Gusmão L, Amorim A et al. Assessing Individual Interethnic Admixture and Population Substructure Using a 48-Insertion-Deletion (INDEL) Ancestry-Informative Marker (AIM) Panel. *Hum Mutat*. 2010; 31(2):184-90.
- 220.Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000; 155(2):945-59.
- 221.Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 2003; 164(4):1567-87.
- 222.Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010; 10:564-567
- 223.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 Genet A*. 2004; 130A(3):265-71.

224. Turhani D, Item CB, Watzinger E, Sinko K, Watzinger F, Lauer G et al. Mutation analysis of CLPTM 1 and PVRL1 genes in patients with non-syndromic clefts of lip, alveolus and palate. *J Craniomaxillofac Surg.* 2005; 33:301-6.
225. Ichikawa E, Watanabe A, Nakano Y, Akita S, Hirano A, Kinoshita A et al. *PAX9* and *TGFB3* are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analyses. *J Hum Genet.* 2006; 51:38-46.
226. Carter TC, Molloy AM, Pangilinan F, Troendle JF, Kirke PN, Conley MR,. Testing Reported Associations of Genetic Risk Factors for Oral Clefts in a Large Irish Study Population Birth Defects Research. 2010; 88:84-93.
227. Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Biedziak B, Paradowska P, Jagodzinski PP. Association between Genetic Variants of Reported Candidate Genes or Regions and Risk of Cleft Lip with or without Cleft Palate in the Polish Population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010; 88:538-45.
228. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005. 21(2):263-5.
229. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007; 81(3):559-75.
230. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013; 7(7):20.

231. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009; 4(7):1073-81.
232. 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; 162:448-53.
233. Genisca AE, Frías JL, Broussard CS, Honein MA, Lammer EJ, Moore CA et al. Orofacial clefts in the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2004. National Birth Defects Prevention Study. *Am J Med Genet A.* 2009; 149A(6):1149-58.
234. Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR et al. Fetal genetic risk of isolated cleft lip only versus isolated cleft lip and palate: A subphenotype analysis using two population-based studies of orofacial clefts in scandinavia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011; 91:85-92.
235. Tsai HJ, Kho JY, Shaikh N, Choudhry S, Naqvi M, Navarro D et al. Admixture-matched case-control study: a practical approach for genetic association studies in admixed populations. *Hum Genet.* 2006; 118:626-39.
236. Slavotinek AM, Chao R, Vacik T, Yahyavi M, Abouzeid H, Bardakjian T. *VAXI* mutation associated with microphthalmia, corpus callosum agenesis and orofacial clefting: the first description of a *VAXI* phenotype in humans. *Hum Mutat.* 2012; 14(2):364-8.
237. Rojas-Martinez A, Reutter H, Chacon-Camacho O, Leon-Cachon RBR, Munoz-Jimenez SG, Nowak S et al. Cleft Lip with or without Cleft Palate in a Mesoamerican Population: Evidence for *IRF6* and Variants at 8q24 and 10q25. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010; 88:535-7.

238. Song L, Li Y, Wang K, Wang YZ, Molotkov A, Gao L et al. Lrp6-mediated canonical Wnt signaling is required for lip formation and fusion. *Development*. 2009; 136:3161-71.
239. Liu F, Millar SE. Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease. *J Dent Res*. 2010; 89:318-30.
240. Leung JY, Kolligs FT, Wu R, Zhai Y, Kuick R, Hanash S et al. Activation of *AXIN2* expression by  $\beta$ -catenin-T cell factor: a feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2002; 277:21657-65.
241. Mostowska A, Biedziak B, Jagodzinski PP. Axis inhibition protein 2 (*AXIN2*) polymorphisms may be a risk factor for selective tooth agenesis. *J Hum Genet*. 2006; 51:262-6.
242. Letra A, Bjork B, Cooper ME, Szabo-Rogers H, Deleyiannis FW, Field LL et al. Association of *AXIN2* with Non-syndromic Oral Clefts in Multiple Populations. *J Dent Res*. 2012; 91:473-8.
243. Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. *AXIN2* and *CDH1* polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2009; 85:169-73.
244. Mostowska A, Hozyasz KK, Wójcicki P, Lasota A, Dunin-Wilczyńska I, Jagodziński PP. Association of *DVL2* and *AXIN2* gene polymorphisms with cleft lip with or without cleft palate in a polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012; 94: 943-50.
245. Papaioannou VE, Silver LM. The T-box gene family. *Bioessays*. 1998; 20:9-19.

246. Kim NY, Kim YH, Park JW, Baek SH. Association between *MSX1* SNPs and Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in the Korean Population. *J Korean Med Sci.* 2013; 28:522-6.
247. Tongkobpetch S, Siriwan P, Shotelersuk V. *MSX1* mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population. *J Hum Genet.* 2006; 51:671-6.
248. Ishii M, Han J, Yen HY, Sucov HM, Chai Y, Maxson REJR. Combined deficiencies of *Msx1* and *Msx2* cause impaired patterning and survival of the cranial neural crest. *Development.* 2005; 132:4937-50.
249. Lin JY, Chen YJ, Huang YL, Tang GP, Zhang L, Deng B et al. Association of bone morphogenetic protein 4 gene polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chinese children. *DNA and Cell Biology.* 2008; 27:601-5.
250. Suzuki S, Marazita ML, Cooper ME, Miwa N, Hing A, Jugessur A et al. Mutations in *BMP4* Are Associated with Sub-epithelial, Microform, and Overt Cleft Lip. *Am J Hum Genet.* 2009; 84:406-11.
251. Suazo J, Tapia JC, Santos JL, Castro VG, Colombo A, Blanco R. Risk variants in *BMP4* promoters for nonsyndromic cleft lip/palate in a Chilean population. *BMC Med Genet.* 2011; 12:163.
252. Chen Q, Wang H, Hetmanski JB, Zhang T, Ruczinski I, Schwender H et al. *BMP4* was Associated with NSCL/P in an Asian Population,” *PLoS One.* 2012; 7(4):e35347.
253. Araujo TK, Simioni M, Félix TM, de Souza LT, Fontes MÍ, Monlleó IL et al. Preliminary Analysis of the Nonsynonymous Polymorphism rs17563 in *BMP4* Gene in Brazilian Population Suggests Protection for Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *Plast Surg Int.* 2012; 247104.

254. Cobourne MT, Xavier GM, Depew M, Hagan L, Sealby J, Webster Z et al. Sonic Hedgehog signaling inhibits palatogenesis and arrests tooth development in a mouse model of the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dev Biol.* 2009; 331(1):38-49.
255. 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; 11(10):48.
256. Putoux A, Nampoothiri S, Laurent N, Cormier-Daire V, Beales PL, Schinzel A et al. Novel *KIF7* mutations extend the phenotypic spectrum of acrocallosal syndrome. *J Med Genet.* 2012; 49:713-20.
257. Dafinger C, Liebau MC, Elsayed SM, Hellenbroich Y, Boltshauser E, Korenke GC et al. Mutations in *KIF7* link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubule dynamics. *J Clin Invest.* 2011; 121(7):2662-7.
258. Yamazaki K, Guo L, Sugahara K, Zhang C, Enzan H, Nakabeppu Y et al. Identification and biochemical characterization of a novel transcription elongation factor, Elongin A3. *J Biol Chem.* 2002; 277(29):26444-51.
259. 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.
260. Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, et al. 2007. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*; 316:1619-22.
261. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009; 17:9-26.

262. Lee NC, Chen M, Ma GC, Lee DJ, Wang TJ, Ke YY et al. Complex rearrangements between chromosomes 6, 10, and 11 with multiple deletions at breakpoints. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A(9):2327-34.
263. He F, Xiong W, Yu X, Espinoza-Lewis R, Liu C, Gu S et al. Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. *Development*. 2008; 135:3871-9.
264. Zhou CJ, Wang YZ, Yamagami T, Zhao T, Song L, Wang K. Generation of Lrp6 conditional gene-targeting mouse line for modeling and dissecting multiple birth defects/congenital anomalies. *Dev Dyn* 2010; 239: 318–26.
265. 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; 129:4135-46.
266. Satokata I, Maas R. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*. 1994; 6:348-56.
267. Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, Topol EJ. Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Curr Opin Genet Dev*. 2009; 19(3):212-9.
268. Park JW, McIntosh I, Hetmanski JB, Jabs EW, Vander Kolk CA, Wu-Chou YH et al. Association between *IRF6* and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. *Genet Med*. 2007; 9:219-27.
269. Letra A, Fakhouri W, Fonseca RF, Menezes R, Kempa I, Prasad JL et al. Interaction between *IRF6* and *TGFA* genes contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *PLoS One*. 2012; 7: e45441.

270. Li MJ, Zhu WL, Wang Y, Guo JZ, Li SQ, Li Y. Association between polymorphism of *IRF6* rs2235371 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2012; 29:149-54.
271. Brito LA, Bassi CFS, Masotti C, Malcher C, Rocha KM, Schlesinger D et al. 2012. *IRF6* is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population. *Am J Med Genet Part A*. 158A:2170-5.



## APÊNDICES

**APÊNDICE I.** Genes e SNPs selecionados para serem genotipados na amostra.

Genes	Localização	nº de SNPs	Identificação
<b><i>LHX8</i></b>	1p31.1	9	rs11162567
			rs1526505
			rs729833
			rs12041465
			rs1852348
			rs12138223
			rs12723906
			rs12409145
			rs941032
<b><i>IRF6</i></b>	1q32.3-q41	8	rs2073485
			rs674433
			rs2013196
			rs7552506
			rs2236908
			rs2073486
			rs2073487
			rs3753518
<b><i>TCEB3</i></b>	1p36.1	5	rs550850
			rs2235541
			rs2076345
			rs2076346
			rs2294495
<b><i>WNT3A</i></b>	1q42	11	rs697761
			rs708113
			rs708121
			rs3094912
			rs708122
			rs10916258
			rs3121309
			rs3121310
			rs13374948
			rs766972
			rs752107
<b><i>SUMO 1</i></b>	2q33	6	rs6717044
			rs3769817
			rs7599810
			rs13000658
			rs6709162
			rs3754931

<i>WNT5A</i>	3p21-p14	8	rs590386 rs10865994 rs1829556 rs7622120 rs11918967 rs472631 rs815541 rs566926
<i>MSX1</i>	4p16.2	2	rs3775261 rs12532
<i>SPRY1</i>	4q28.1	3	rs300566 rs300572 rs300574
<i>WNT8A</i>	5q31	4	rs10041787 rs10036244 rs2040862 rs6596422
<i>MSX2</i>	5q35,2	4	rs4868442 rs4868443 rs4242182 rs2381939
<i>TFAP2A</i>	6p24	7	rs537112 rs533558 rs303048 rs303050 rs3798694 rs1675414 rs654351
<i>PRSS35</i>	6q14.2	10	rs592911 rs1884951 rs579599 rs1171114 rs6903293 rs4706180 rs512140 rs535787 rs504593 rs548692
<i>HOXA2</i>	7p15.2	2	rs706017 rs2428431
<i>SHH</i>	7q36	1	rs1233556
<i>SOX7</i>	8p23.1	7	rs11250064 rs13261103 rs1139843 rs4841432 rs10100209

			rs7009920 rs6995692
<b>FOXE1</b>	9q22	2	rs1443435 rs10984009
<b>PTCH1</b>	9q22.3	9	rs357563 rs16909859 rs16909865 rs357564 rs2066836 rs574688 rs2297087 rs473902 rs10512249
<b>VAX1</b>	10q26.1	3	rs7086344 rs10787760 rs6585429
<b>TBX10</b>	11q13.2	6	rs3765088 rs11227871 rs2514022 rs3758938 rs2514027 rs1993839
<b>WNT11</b>	11q13.5	11	rs598143 rs12277860 rs17749202 rs7936750 rs10899175 rs1533763 rs882151 rs3781730 rs4944092 rs689095 rs608747
<b>SPRY2</b>	13q31.1	5	rs1928573 rs4728 rs7329343 rs504122 rs563692
<b>PAX9</b>	14q13.3	13	rs2236007 rs2295218 rs12893199 rs17104914 rs1955734 rs17104923 rs8004560 rs17104928 rs17176643 rs11156926

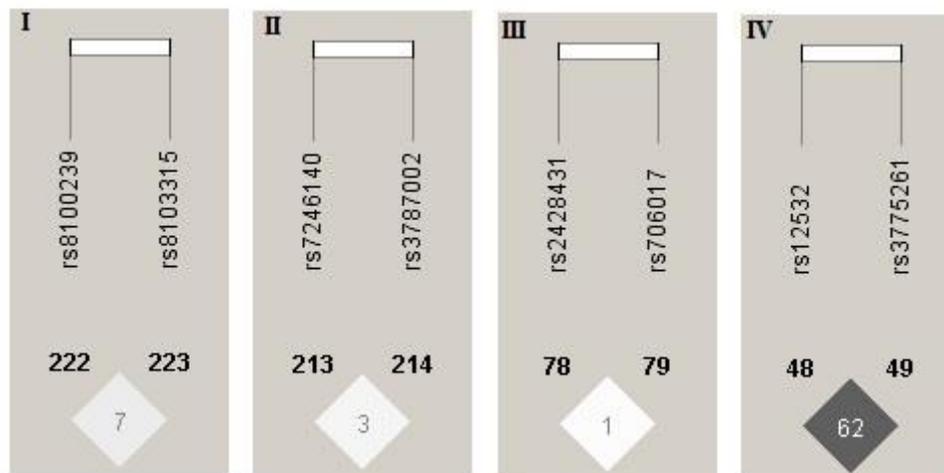
			rs10131337 rs7144276 rs11847165
			rs7156293 rs3917210 rs2284791 rs4252340 rs3917187 rs3917180 rs4252328 rs2268625 rs2284792 rs3917158 rs2268626 rs3917148 rs11466414
<b>TGFB3</b>	14q24	13	
			rs17563 rs2071047 rs762642
<b>BMP4</b>	14q22-q23	3	
			rs2272591 rs9972231 rs2293806 rs3784240 rs2072673 rs11621316
<b>JAG2</b>	14q32	6	
			rs1528734 rs7497354 rs9920024 rs10519738 rs16973303 rs11854391 rs12915554 rs7162202 rs3743103 rs10318 rs1129456 rs7176378
<b>GREM1</b>	15q13.3	12	
			rs1054435 rs12914042 rs4932238 rs9672286 rs4932240
<b>KIF7</b>	15q26.1	5	
			rs2074222 rs222837 rs222836 rs2074216 rs222835 rs222850
<b>DVL2</b>	17p13.1	6	

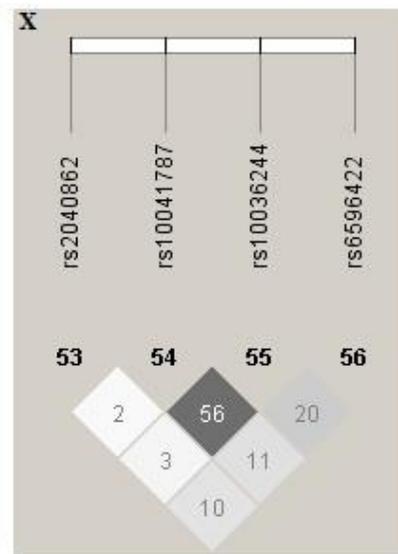
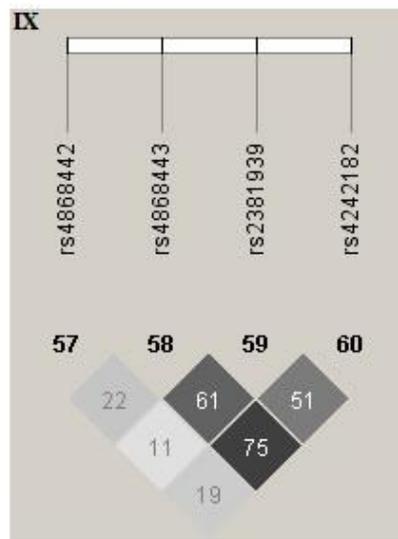
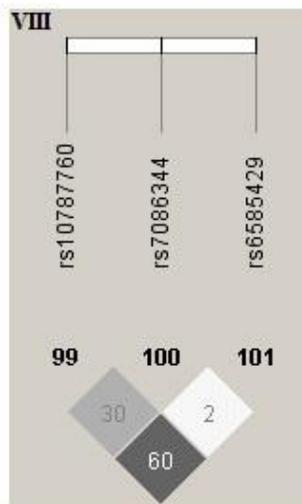
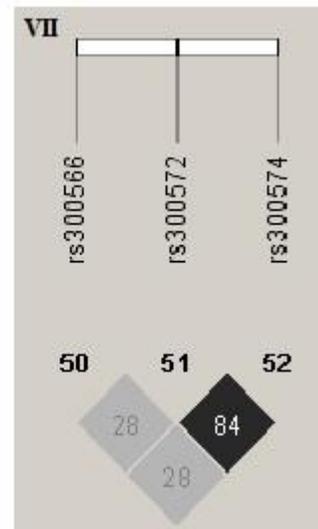
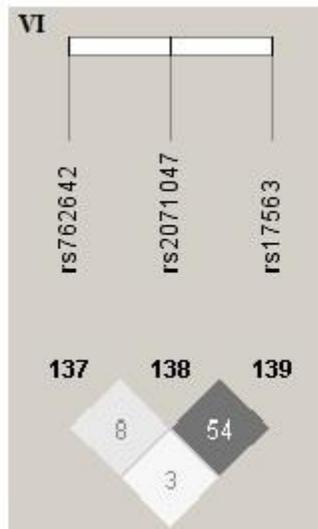
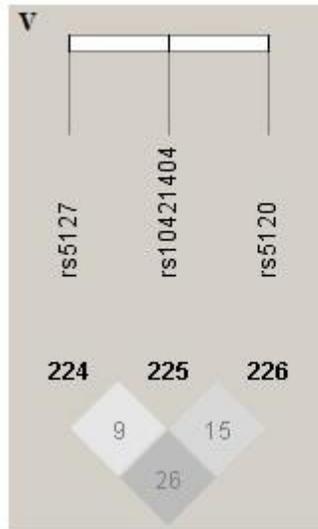
<i>RARA</i>	17q21	9	rs7217852 rs9904270 rs12946680 rs2715554 rs2715553 rs482284 rs9894845 rs4890109 rs2229773
<i>ERBB2</i>	17q12	8	rs2517955 rs2517956 rs1565923 rs2952155 rs4252612 rs4252632 rs2952156 rs4252665
<i>WNT9B</i>	17q21	9	rs4968280 rs12150651 rs1443311 rs12601196 rs2165846 rs12952746 rs6504591 rs11079740 rs1530364
<i>AXIN2</i>	17q23-q24	11	rs11868547 rs7591 rs7224837 rs7210356 rs11655966 rs4128941 rs4791171 rs11079571 rs3923087 rs3923086 rs2240308
<i>FGF22</i>	19p13.3	2	rs7246140 rs3787002
<i>TGFBI</i>	19q13.1	7	rs8179181 rs8110090 rs11466334 rs1800472 rs4803455 rs2241715 rs1800469
<i>APOC2</i>	19q13.2	3	rs5120 rs5127 rs10421404

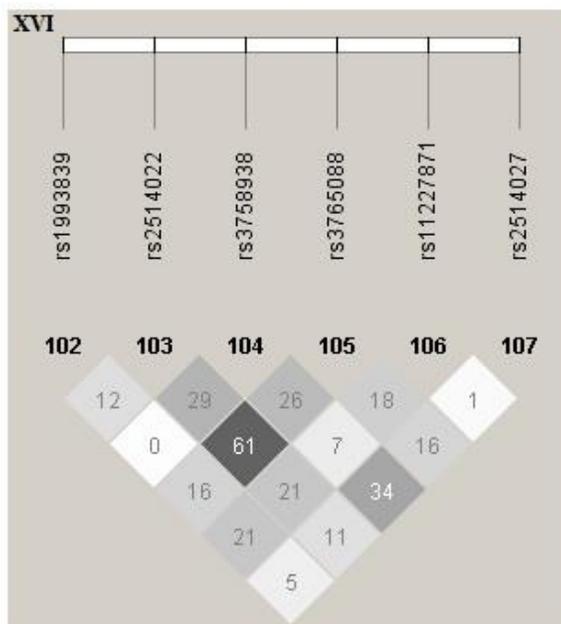
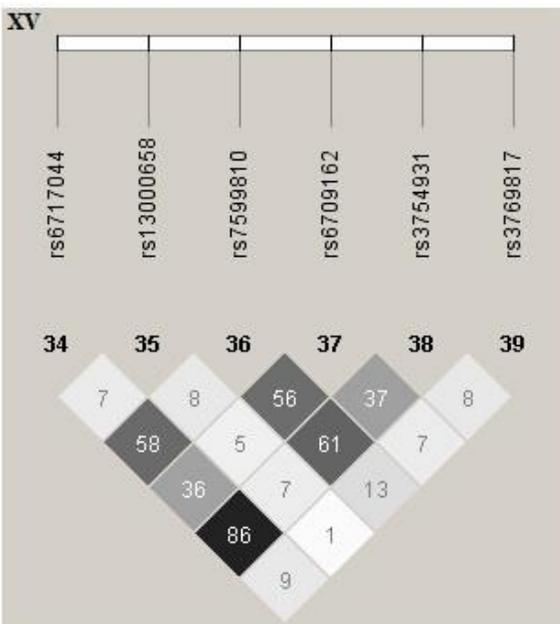
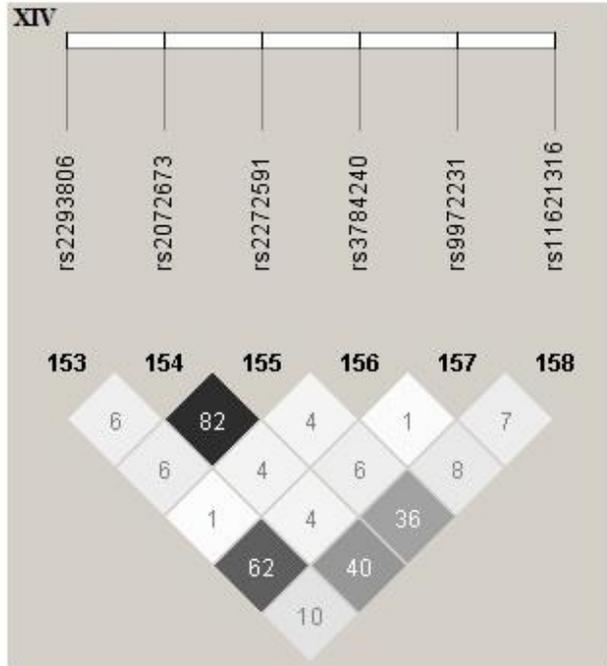
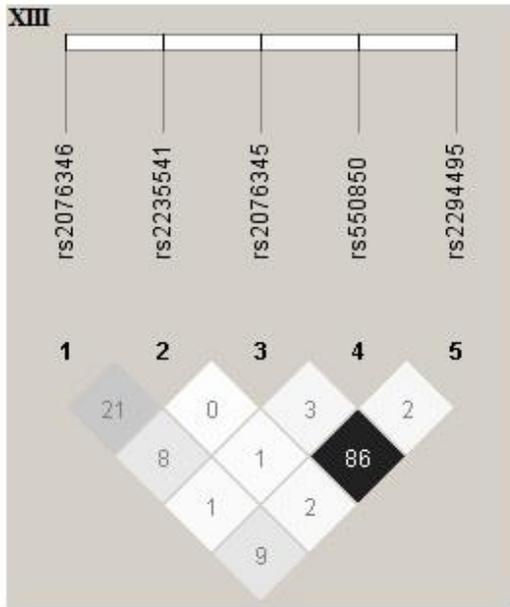
			rs2239375 rs204905 rs760114 rs11668758 rs16979595 rs204478 rs2075620 rs7257916 rs8111069 rs204468 rs875255
<b><i>CLPTM1</i></b>	19q13.3	11	
			rs8100239 rs8103315
<b><i>BCL3</i></b>	19q13.1-q13.2	2	
			rs8137465 rs1978060 rs2301558 rs2238777 rs2238778 rs737869 rs2073762 rs4819522
<b><i>TBX1</i></b>	22q11.21	8	
			rs1429591 rs195293
<b><i>TBX22</i></b>	Xq21.1	2	

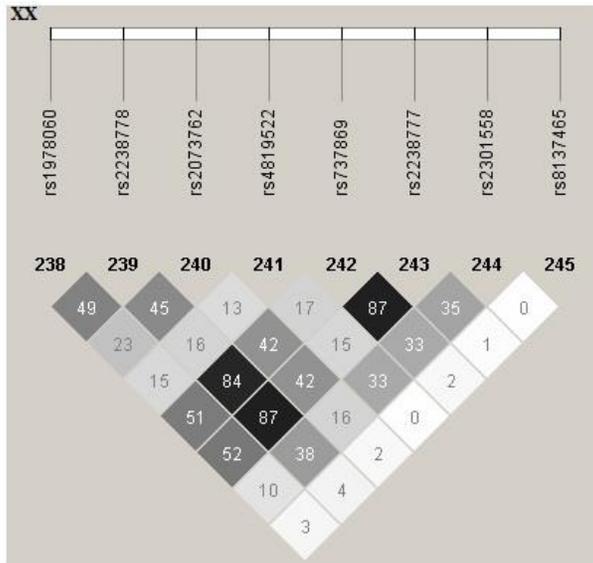
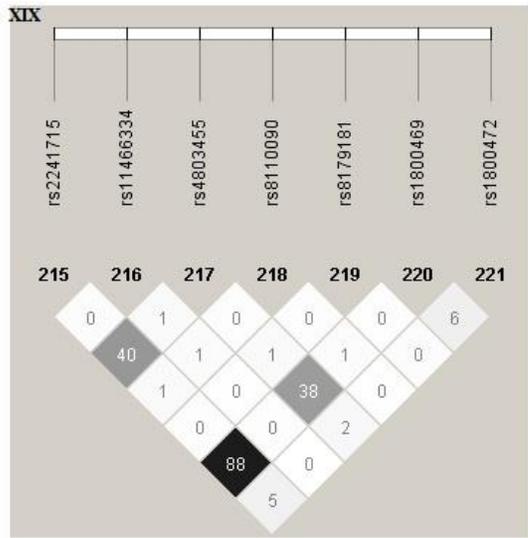
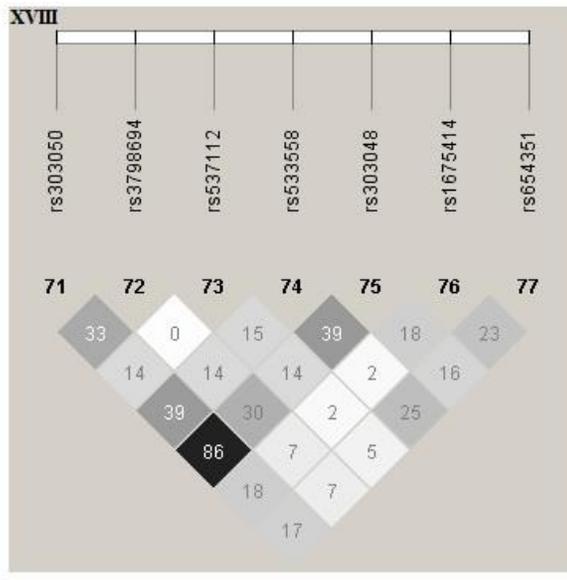
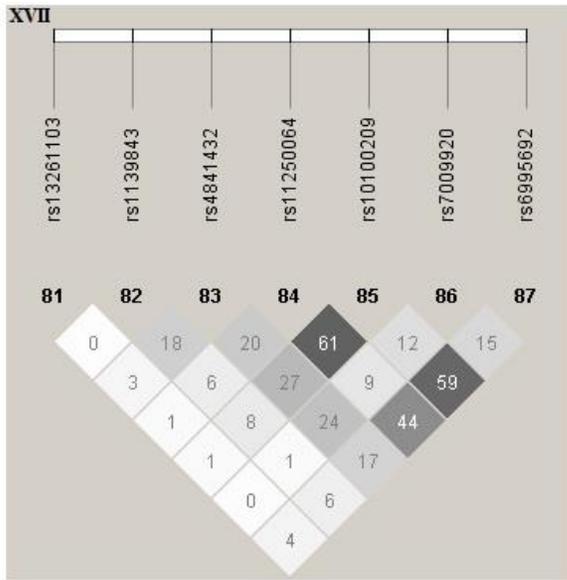
---

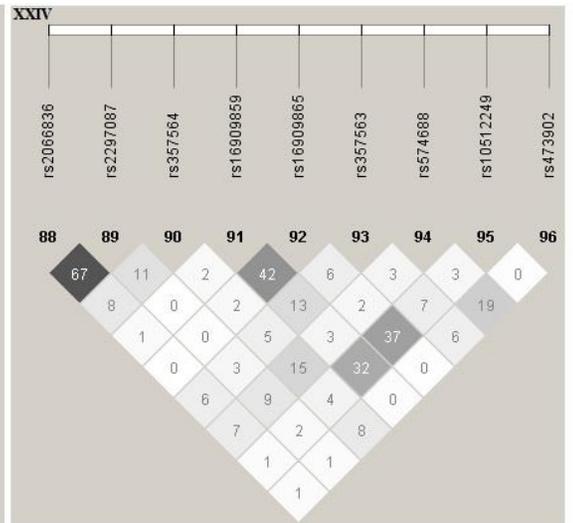
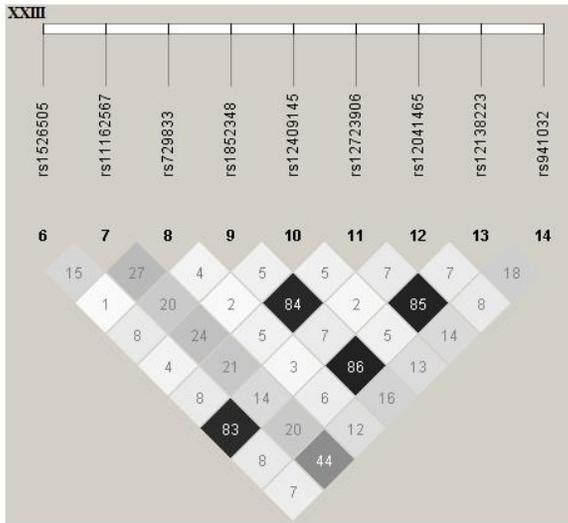
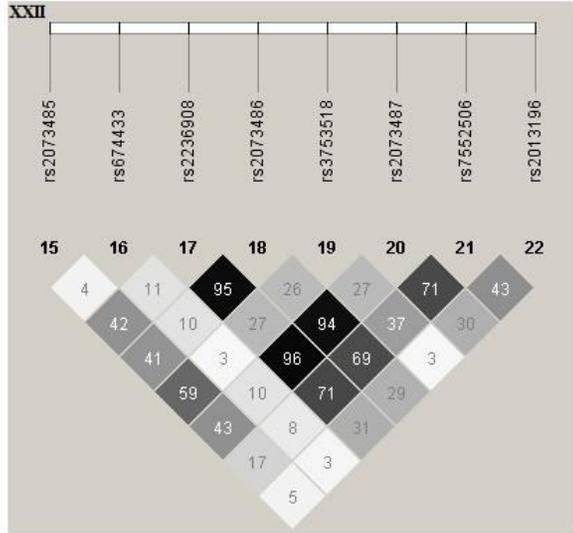
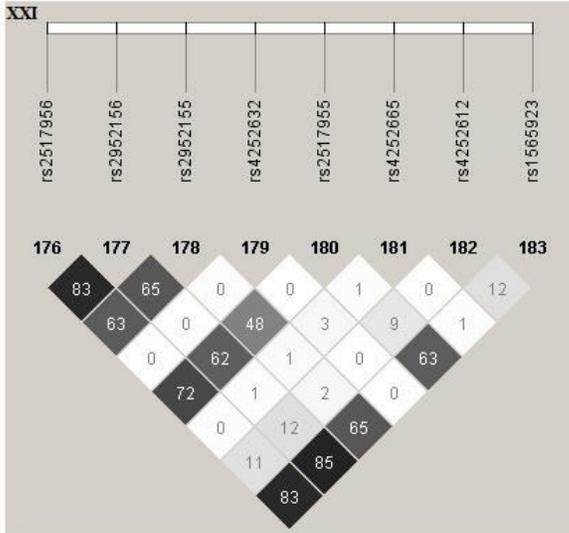
**APÊNDICE II.** Estimativa dos valores de desequilíbrio de ligação entre os SNPs em termos de  $r^2$  para os genes (I-*BCL3*, II-*FGF22*, III-*HOXA2*, IV-*MSX1*, V-*APOC2*, VI-*BMP4*, VII-*SPRY1*, VIII-*VAX1*, IX-*MSX2*, X-*WNT8A*, XI-*KIF7*, XII-*SPRY2*, XIII-*TCEB3*, XIV-*JAG2*, XV-*SUMO1*, XVI-*TBX10*, XVII-*SOX7*, XVIII-*TFAP2A*, XIX-*TGFB1*, XX-*TBX1*, XXI-*ERBB2*, XXII-*IRF6*, XXIII-*LHX8*, XXIV-*PTCH1*, XXV-*WNT5A*, XXVI-*RARA*, XXVII-*WNT9B*, XXVIII-*PRSS35*, XXIX-*AXIN2*, XXX-*CLPTM1*, XXXI- *GREM1*, XXXII-*PAX9*, XXXIII-*TGFB3*, XXXIV-*WNT3A*, XXXV-*WNT3A*, XXXVI-*DVL2*, XXXVII-*TBX22*).

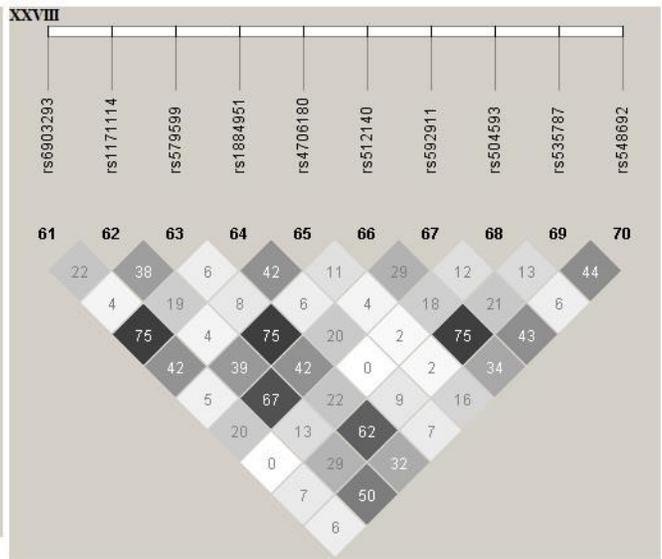
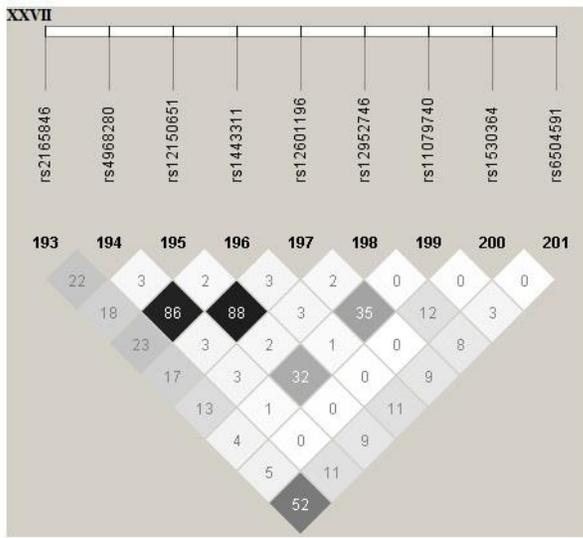
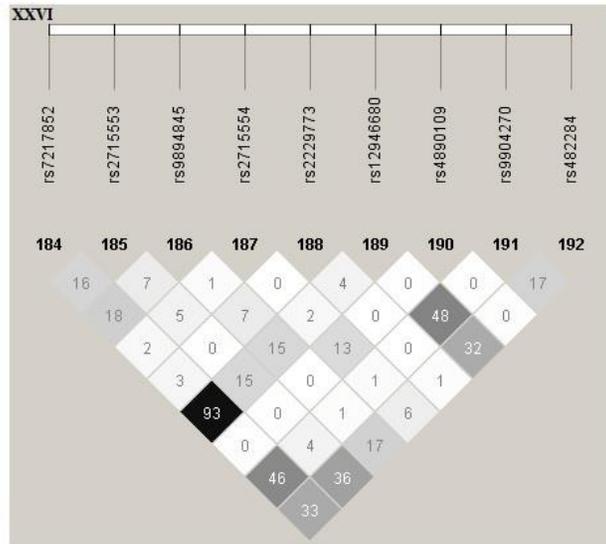
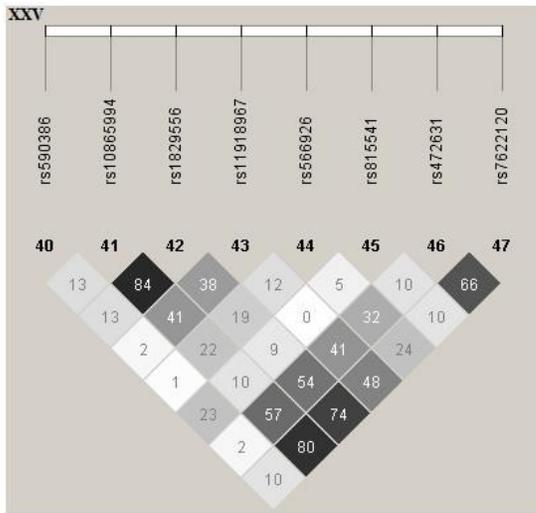












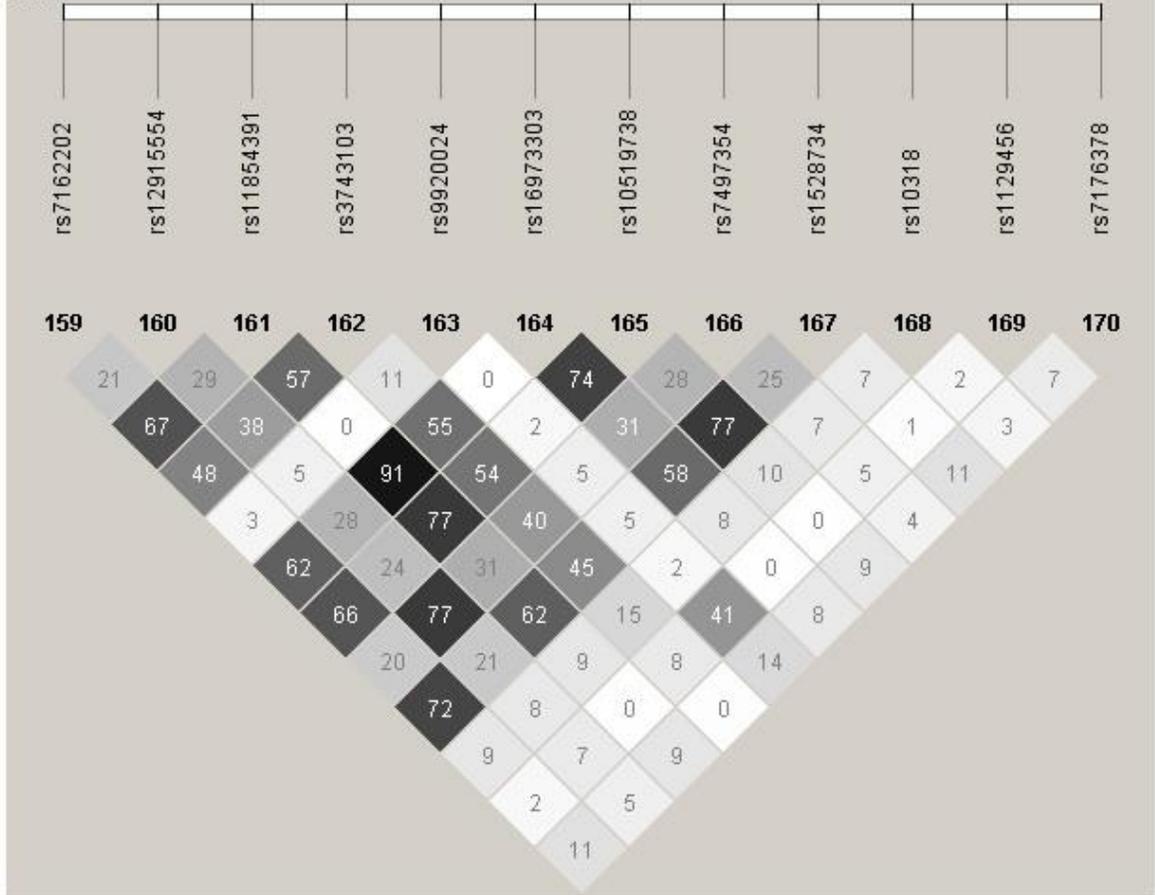
XXIX



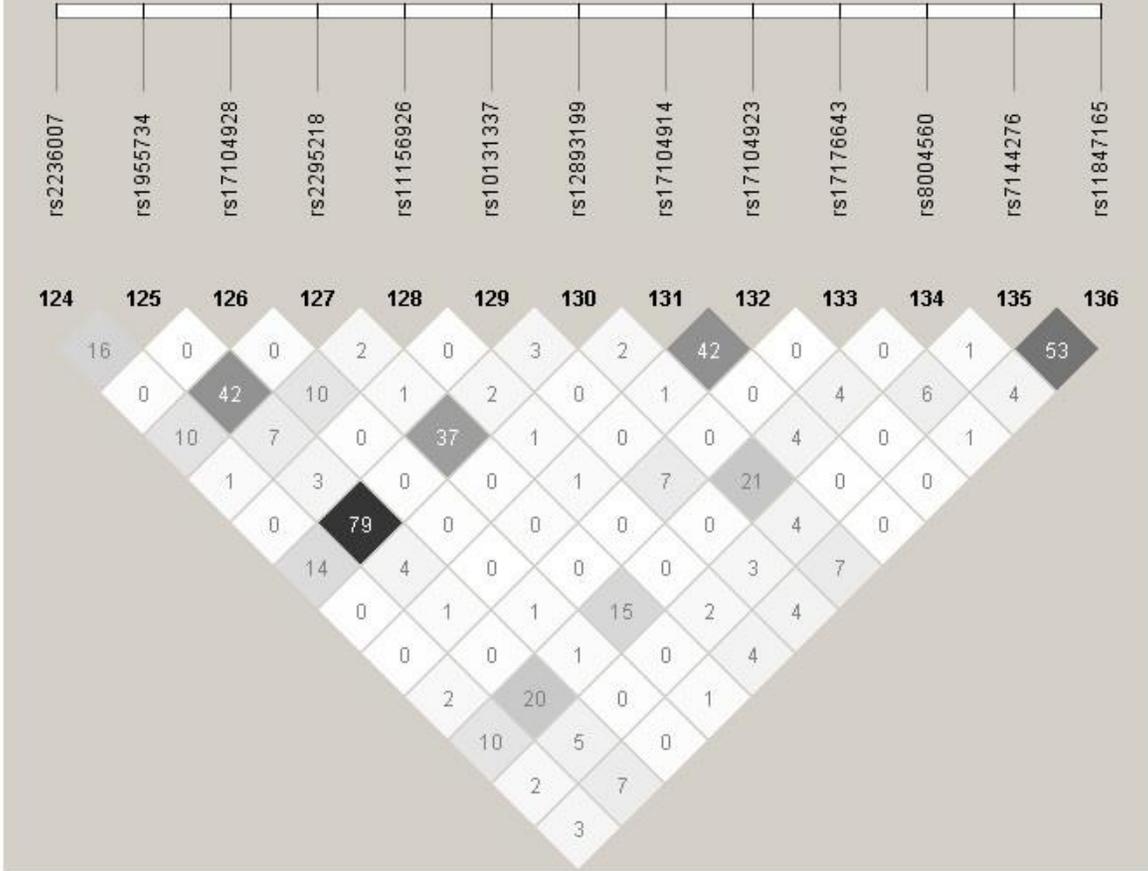
XXX



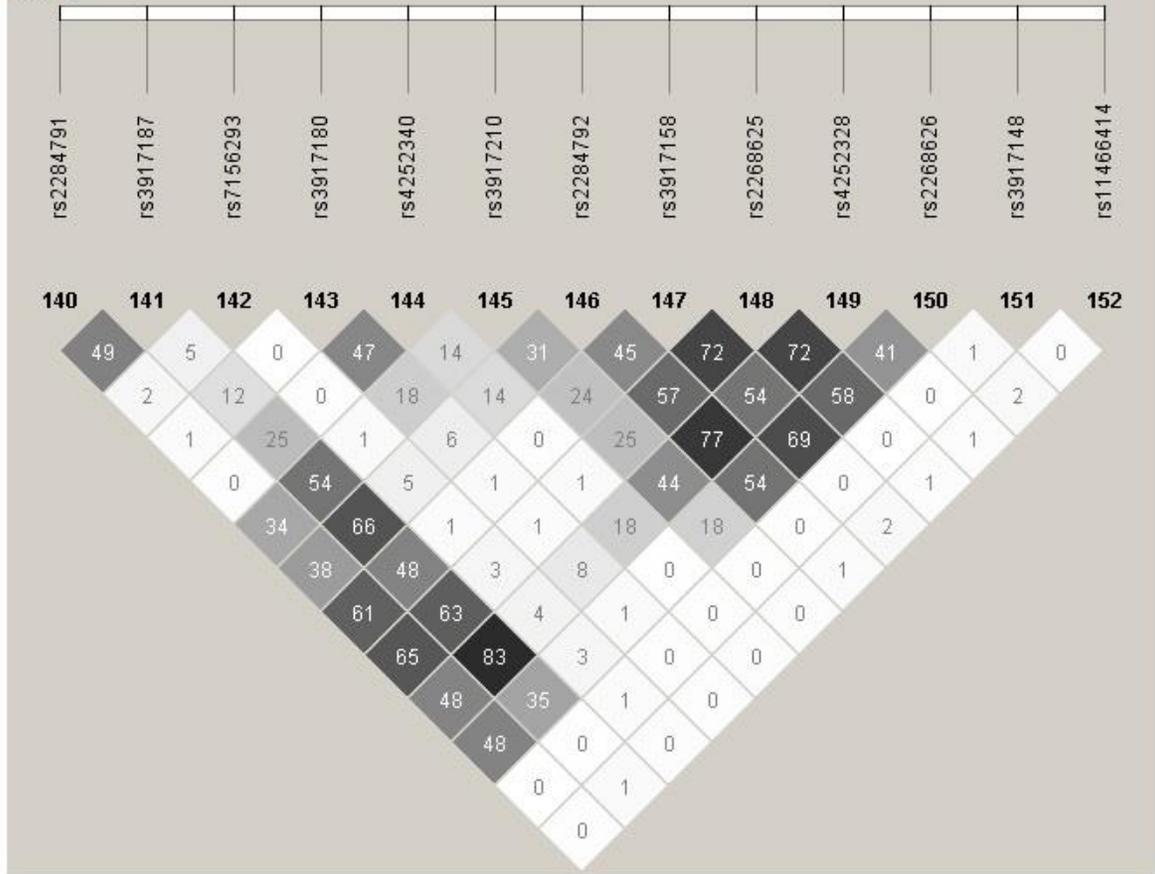
XXXI



XXXII



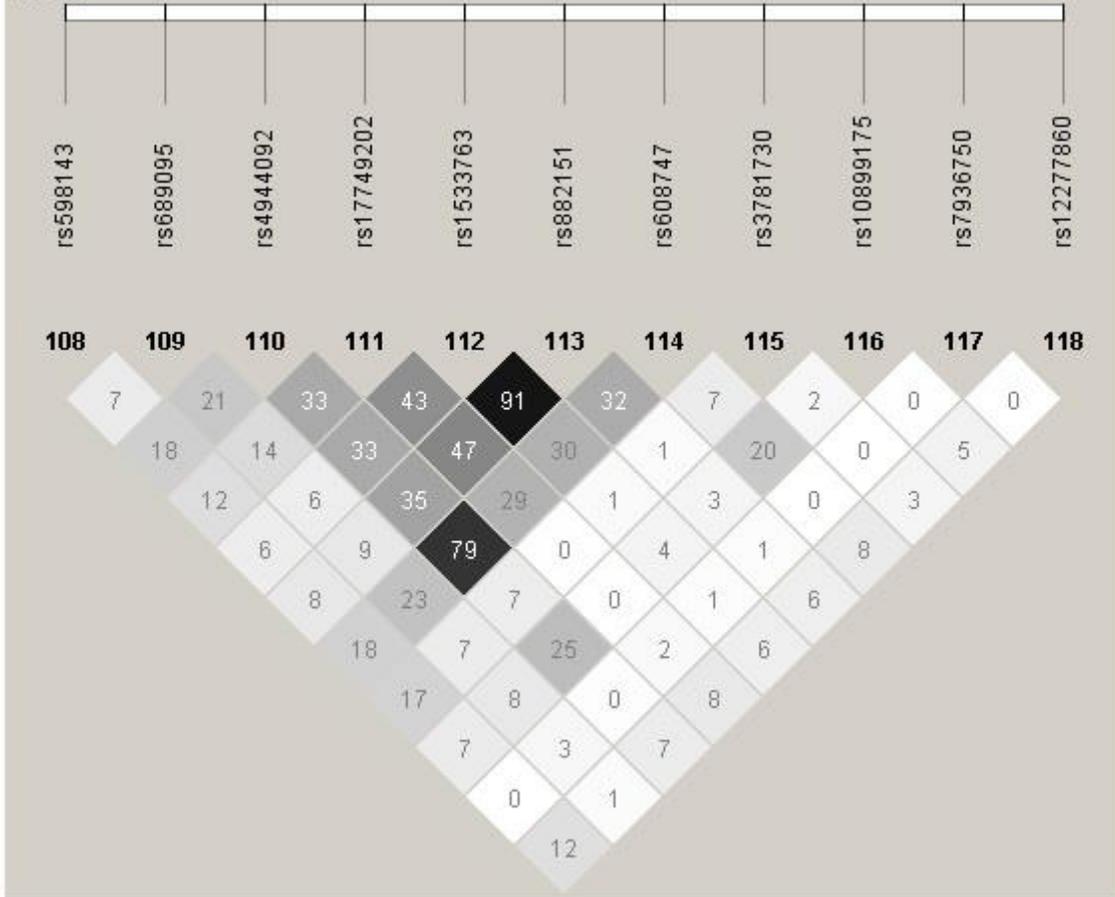
XXXIII

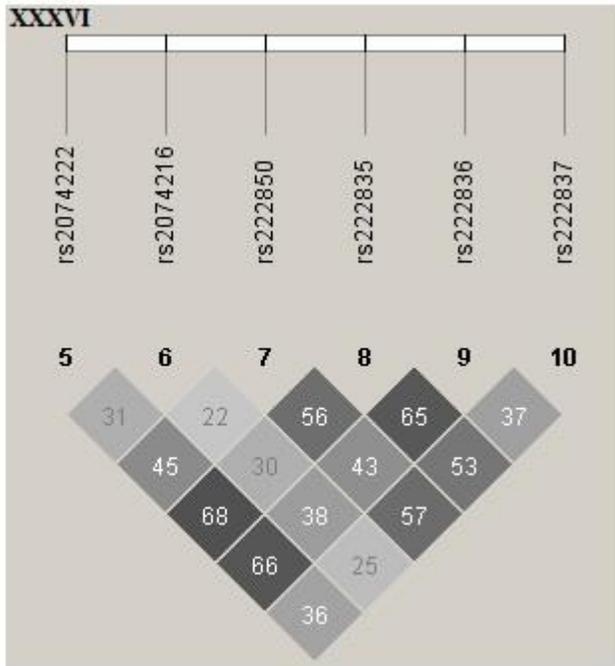


XXXIV



XXXV





## ANEXOS

**ANEXO I.** Nomenclatura e definições clínicas adotadas pela *International Clearinghouse for Birth Defects and Surveillance and Research* para a descrição e classificação das fendas orofaciais (ICBDSR 2007).

**Distúrbio congênito:** compreende qualquer anormalidade da estrutura e/ou função do corpo, incluindo o metabolismo, que se faz presente a partir do nascimento. Pode, portanto, ser óbvio no recém-nascido, manifestar-se na infância ou em idades mais avançadas.

**Defeito *major* (grave):** qualquer defeito morfológico e/ou funcional com impacto relevante sobre a saúde, podendo levar à morte ou incapacidade permanente.

**Defeito isolado:** qualquer caso com apenas um defeito grave ou Sequência. Exemplo: fenda labial bilateral + deformidades nasais.

**Sequência:** qualquer caso com dois ou mais defeitos que tem um defeito primário (grave) em comum. Esses defeitos devem fazer parte de uma cascata de eventos embriológicos ou estar patogenicamente relacionados. De acordo com essa definição, uma sequência é um defeito isolado. Exemplo: Sequência de Pierre Robin, dois ou mais defeitos cardíacos.

**Defeitos não relacionados:** aqueles que ocorrem em diferentes órgãos, sistemas ou locais do corpo e não fazem parte de uma cascata de eventos embriológicos, não são patogenicamente relacionados ou não têm um defeito primário grave em comum. Exemplo: fenda labiopalatal bilateral + anoftalmia. O quadro clínico pode ser

reconhecido como uma “síndrome” quando um único fator etiológico é demonstrado ou considerado muito suspeito pela comunidade científica.

**Síndrome:** qualquer combinação de dois ou mais defeitos graves devida a um fator etiológico único já demonstrado (ex.: anomalia cromossômica) ou fortemente suspeito com base em sua recorrência em determinado número de casos (ex.: Síndrome de Catel-Manzke).

**Síndrome conhecida:** situação em que uma denominação específica pode ser atribuída ao quadro clínico e este pode ser codificado usando a CID 10 e/ou OMIM. Quando uma anormalidade cromossômica é identificada, a fórmula do cariótipo deve ser usada como código.

**Defeitos múltiplos:** Qualquer combinação de dois ou mais defeitos graves para os quais nenhum fator etiológico foi demonstrado ou suspeito.

**Defeitos aditivos randômicos:** Qualquer combinação de dois ou mais defeitos graves com clara evidência de fatores etiológicos distintos.

CID 10: Classificação Internacional de Doenças, 10ª revisão; OMIM: *On-line Mendelian Inheritance In Man*.

## ANEXO II. Parecer do Comitê de Ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 30/10/08.  
(Grupo II)

**PARECER CEP:** N° 714/2008 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0573.0.146.000-08

### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “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”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Milena Simioni

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas / UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 10/09/2008

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 30/10/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

### II - OBJETIVOS

Contribuir para o esclarecimento e caracterização do mecanismo gênico e mecanismo de interação gênica envolvidos na determinação das fendas orais.

### III - SUMÁRIO

Projeto de doutorado, contendo quatro grupos de indivíduos: (grupo 1) casos familiares de fendas labiopalatais e palatais não-sindrômica, incluindo indivíduos afetados e normais; (grupo 2) casos isolados de fendas labiopalatais e palatais não-sindrômica e, quando possível, seus genitores; (grupo 3) casos isolados de fendas labiopalatais e palatais sindrômica e, quando possível, seus genitores; (grupo 4) indivíduos controles, sem história de fenda labiopalatal ou palatal em 3 gerações. Os sujeitos serão recrutados no Ambulatório de Dismorfologia (HC-UNICAMP), e os normais serão voluntários. Para análise será utilizado o programa GeneChip Operating Software, (a ser financiado pela FAPESP), autorização do superintendente da instituição, entretanto o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido não contempla os itens a, c, d, f, g e h da forma como posto na Resolução CNS/MS 340/04.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



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

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

#### 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 ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem 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 tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

#### VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de setembro de 2008.

*Prof. Dra. Carmên Sílvia Bertuzzo*  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM/UNICAMP



CEP, 26/08/11.  
(PARECER CEP: Nº 714/2008)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa](http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa)

## PARECER

### I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “USO DA TÉCNICA DE SNP ARRAY PARA DETECÇÃO DE VARIACÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS DO DNA (COPY NUMBER VARIATION, CNV) EM DEFEITOS CONGÊNITOS DE HERANÇA COMPLEXA: AS FENDAS ORAIS COMO MODELO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Milena Simioni

### II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a aplicação das novas técnicas *Open array* e *SNP array*, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

### III – DATA DA REUNIÃO.

Aprovado “ad referendum” em 26 de agosto de 2011.

A ser homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de setembro de 2011.

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
[cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

Página 1 de 1

### **ANEXO III.** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**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 Chromatography*, (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 conseqüências 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 IV.** Protocolo de extração de DNA por Kit (Quiagen)

- 1 – Descartar o plasma (parte superior). Cuidado para não descartar a parte intermediária (leucócitos);
- 2 – Transferir 2ml ou 1ml do sangue (se utilizar 1ml, adicionar 1ml de PBS) (parte intermediária e inferior) para um tubo falcon de 15 ml;
- 3 – Adicionar 200µl de protease (previamente diluída em H<sub>2</sub>O)
- 4 – Adicionar 2,5ml de tampão AL
- 5 – Inverter os tubos por 10 minutos.
- 6 – Agitar no vortex por 10 segundos.
- 7 – Deixar em banho Maria a 70°C por 10 min.
- 8 – Adicionar 2ml de Etanol 100% (Merck)
- 9 – Inverter os tubos por 10 minutos
- 10 – Agitar no vortex por 10 segundos.
- 11 – Transferir toda a solução para o tubo da coluna
- 12 – Centrifugar a 4.000 rpm por 4 min.
- 13 – Tirar a coluna e descartar o filtrado. Limpar a borda próxima a coluna para retirar respingos presentes no tubo.
- 14 – Adicionar 2ml do tampão AW1 (previamente diluído em etanol 100%)
- 15 - Centrifugar a 4.000 rpm por 4 min (NÃO DESCARTAR SOBRENADANTE)
- 16 – Adicionar 2ml do tampão AW2 (previamente diluído em etanol 100%)
- 17 – Centrifugar a 4.000 rpm por 15 min.
- 18 – Limpar respingos que possam existir na coluna. Colocar a coluna em um tubo Falcon novo.

19 – Adicionar 150µl do tampão AE, espalhando por toda a membrana. Deixar a temperatura ambiente por 7 min.

20 – Centrifugar a 4.000 rpm por 3 min.

21 – Pegar o filtrado e colocar novamente na coluna

22 - Deixar à temperatura ambiente por 7 min.

23 – Centrifugar a 4.000 rpm por 3 min.

24 – Deixar entrar em solução overnight e depois colocar no tubo criogênico e guardar no freezer.

## **ANEXO V.** Protocolo de extração de DNA pelo método Fenol-Clorofórmio

### Extração de DNA – 1ª fase

1. Coletar o sangue em EDTA ou ACD, em tubos de vacunteiner em 2 alíquotas de 7-10mL.
2. Centrifugar o sangue por 10min a 2500rpm e descartar o plasma.
3. Transferir os leucócitos (+- 4mL) para um tubo falcon. Adicionar tampão RSB 1x até completar o volume final de 11mL no tubo. Homogeneizar por 10min.
4. Adicionar 6 gotas de nonidet P40. Homogeneizar por 10min.
5. Centrifugar por 10min a 2500rpm e desprezar o sobrenadante.
6. Ressuspender o pellet em 500µL de tampão RSB 1x.
7. Lisar os núcleos com 3mL de SDS e misturar por inversão repetidamente.
8. Adicionar 80µL de proteinase K. A concentração final deve ser de 100µg/mL. Encubar por 2-3h ou overnight a 37°C.
9. Esperar 1 semana para a 2ª fase.

### Extração de DNA – 2ª fase

1. Adicionar 3mL de fenol saturado. Misturar, invertendo o tubo gentilmente, e homogeneizar por 10min. Centrifugar por 10min a 2500rpm.
2. Remover a porção superior do tubo (transparente) com uma pipeta pasteur para outro tubo falcon. Tomar cuidado para não agitar a porção inferior, a qual será descartada.
3. Adicionar 1,5mL de clorofórmio álcool isoamílico e 1,5mL de fenol saturado. Homogeneizar por 10min e centrifugar por 10min, 2500rpm. Remover a porção inferior do tubo (fenol) com pipeta Pasteur e descartar.

4. Adicionar 3mL de clorofórmio álcool isoamílico, misturar a solução e homogeneizar por 10min. Centrifugar a 2500rpm por 10min. Remover completamente a porção inferior do tubo e descartar.
5. Adicionar 6mL de etanol 100% gelado e misturar levemente, até observar a precipitação do DNA.
6. Levar o frasco para a geladeira overnight.
7. “Pescar” o DNA precipitado com pipeta Pasteur de vidro e ressuspendê-lo em 200-250 $\mu$ L de TE 1x.

**ANEXO VI.** Protocolo de purificação do *kit MilliUni*.

1. Aplicar 500µl do DNA na coluna com o tubo coletor (caso não tenha este volume de DNA completar com H<sub>2</sub>O deionizada)
2. Centrifugar a 14.000 G ou 14.000 RFC (temperatura ambiente) por 12 minutos.
3. Colocar a coluna em um novo tubo coletor de ponta cabeça e centrifugar por 2 minutos a 1000 G ou 1000 RCF.
4. No tubo coletor ficará a amostra concentrada e limpa.

## ANEXO VII. Protocolo para realização do ensaio de *Open Array*.

### 1. Escolha das sequências:

A. Made to order: São os ensaios que já foram validados pela *Applied* e estão no banco de dados deles.

- No site da *Applied BioSystems*, clicar na aba [Produtos]
- Para genotipagem, clicar em [*TaqMan SNP Genotyping Assay*]
- Clicar na aba [*Assay Search*]
- Procurar o SNP pelo rs, ou pelo ID.

B. Customizados – Ensaios ainda não validados pela *Applied*, tendo que ser “montado” do zero.

- Sabendo o SNP que deseja, entrar no dbSNP ou outro banco de dados que forneça as sequências próximas do SNP.
- Selecionar aproximadamente 250-300pb, sendo que o SNP deve ter no mínimo 100pbs a sua esquerda e 100pbs a sua direita (onde serão desenhados os primers e as sondas).
- Entrar no site [*RepeatMasker*] – [www.repeatmasker.org](http://www.repeatmasker.org)
- Clicar em [*Repeating Masking*]
- Colar a sequência desejada para o ensaio contendo o nucleotídeo correto, sem o SNP e o sinal [X/Y] coletada conforme informações acima.
- Verificar a presença de regiões repetitivas no genoma através da letra “N”. Onde aparecer a letra N após o mascaramento, a *Applied* não desenhará nem primer, nem sonda alguma, para não ter problema de inespecificidade.

- Copiar a sequência que o *RepeatMasker* gera, contendo os “N” e adicionar a sequência, junto com os demais ensaios já verificados para a placa (podem ser tanto o ID, quanto as sequências), pelo software [*FileBuilder*].

## 2. Escolha do layout:

2.1. Escolher o layout da placa de *OpenArray*.

2.2. Inserir os dados do layout e dos ensaios contendo as mutações a serem analisadas no software *File Builder*, da *Applied BioSystems*.

## 3. Preparo das amostras:

3.1. Avaliar o grau de pureza utilizando o NanoDrop ou NanoVue: Valor de  $A_{260/230}$  e  $A_{230/280}$  entre 1,8 e 2,0

3.2. Quantificar utilizando o Qubit.

3.3. Carregar as amostras na placa de 384 well

3.4. Utilizar, para cada ensaio, concentração inicial de 50 ng/μL (são necessárias 250 cópias do genoma haploide)

	Volume em μL		
	Layout de 16 ensaios	Layout de 32 ensaios	Demais Layouts
Amostra de DNA (concentração: 50ng/μL)	1,5	2,0	2,5
<i>TaqMan OpenArray Genotyping Master Mix</i>	1,5	2,0	2,5
VOLUME FINAL	3,0	4,0	5,0

3.5. Selar a placa para evitar evaporação de amostras, pois o volume é pequeno

3.6. Após selar a placa de 384, dar um spin a 1000rpm por 1 minuto.

3.7. Carregar o mix na placa de *OpenArray* em até 30 minutos.

## 4. Carregamento da placa *OpenArray* com o *AccuFill*

- 4.1. Ligar o computador por primeiro
- 4.2. Ligar o *AccuFill* em seguida
- 4.3. Verificar a limpeza interna do *AccuFill*
- 4.4. Posicionar a caixa de ponteiros (Tips) no local específico, sem a tampa!
- 4.5. Posicionar a placa de 384 poços contendo a amostra e o mix. Não esquecer de retirar o selante do quadrante que for utilizar.
- 4.6. Posicionar a lâmina de *OpenArray* no local indicado. O Código de barras fica no lado esquerdo (“*Left to Load*”)
- 4.7. Fechar o *AccuFill*
- 4.8. Abrir o software *AccuFill*
- 4.9. Fazer o *Self-Test*
- 4.10. Clicar em <*Setup and Load*>
- 4.11. Nomear o experimento
- 4.12. Escolher qual posição a lâmina de *OpenArray* ocupará
- 4.13. Fazer a leitura do código de barras da lâmina
- 4.14. No campo <*Samples per subarray*>, escolher quantas amostras terá por *subarray*.  
No caso de uma placa de 32 ensaios/ 96 amostras, a quantidade de amostras por *subarray* é de 2.
- 4.15. Escolher <*Plate Holder*>, onde estará a lâmina de *OpenArray*, selecioná-lo e, com o scan, ler o código de barras do chip.
- 4.16. Clicar em <*Next*>.
- 4.17. No mapa da caixa das ponteiros (*Tip Box*), selecionar os quadrantes das ponteiros que serão utilizadas.

4.18. Preparar a *case* com o líquido de imersão antes de posicionar a lâmina de *OpenArray*. (A lâmina carregada dura apenas 1'30" fora do fluido)

4.19. Clicar em <Load> e aguardar o término do carregamento.

## **5. Estabilizando a lâmina de *OpenArray***

5.1. Após colocar a lâmina de *OpenArray* dentro da *case* com líquido de imersão, certificar que o mesmo está cobrindo toda a placa do *OpenArray*, sem ter nenhuma bolha!

5.2. Selar a *case* com a goma, adicionando de forma que não fique nenhuma bolha também. OBS: A goma é fotosensível, então não se deve demorar muito para aplicá-la, muito menos esquece-la em local iluminado, pois corre o risco de endurecer.

5.3. Posicionar a *case* completa na estação de selagem, de tal forma que a borda preta da *case* esteja voltada para frente e o código de barras para cima.

5.4. Ligar a estação por, no mínimo, 2 minutos, no caso de placa para genotipagem, ou 3 minutos de cada lado, para placa de expressão gênica.

## **6. Termociclador**

6.1. Posicionar as bordas pretas das *cases* para cima, juntamente com a “espuma” para pressionar a placa na chapa do termociclador.

6.2. Correr o programa <OPENARRAY>. Duração de aproximadamente 4h.

6.3. Retirar a *case* com cuidado, pois a espuma pode ficar grudada, aumentando o risco da placa de *OpenArray* cair.

## **7. Leitura da Lâmina no *Biotrove***

7.1. Ligar o computador do *Biotrove*

- 7.2. Fazer uma cópia do CD inteiro que veio com os ensaios na pasta [C://Programs Files/Biotrove/PlateFiles]
- 7.3. Ligar o *Biotrove*
- 7.4. Abrir o software *OpenArray SNP Genotyping Analysis*
- 7.5. Para acender ou apagar a luz no interior do *Biotrove*, entrar no *software*, clicar em <Actions> e clicar em <Light On> ou <Light Off>.
- 7.6. Ao abrir o *Biotrove*, haverá local para posicionar 3 *cases* para a leitura, respeitando sempre as posições 01, 02 e 03. A *case* que ficar no fundo do aparelho é a 01, a do meio 02 e a mais próxima da porta é a 03.
- 7.7. Colocar a *case* no *Biotrove*. A borda preta da *case* deve estar para cima, e o código de barras da placa de *OpenArray* deve estar voltado para cima e para a direita (“*Right to Read*”)
- 7.8. No *software*, clicar em <Image>
- 7.9. Na janela que se abrirá, clicar em <Locate Files> e escolher o arquivo contendo as informações da lâmina, presente na pasta *PlateFiles* correspondente.
- 7.10. Colocar as informações das amostras no campo <Sample ID>: é obrigatório e podem ser importados a partir do *Excel*.
- 7.11. Para nomear cada ensaio, ainda na janela <Image>, após o carregamento do arquivo.spf correspondente ao ensaio, clicar em <Edit>.
- 7.12. Editar e clicar em <OK>.
- 7.13. A leitura tem duração de aproximadamente 40’ por lâmina
- 7.14. Após a leitura, utilizar um CD para copiar o arquivo .spf para ser lido no *Genotyper software*.