

*TÂNIA KAWASAKI DE ARAUJO*

INVESTIGAÇÃO DOS GENES *TFAP2A* E *BMP4*  
EM INDIVÍDUOS COM FENDAS OROFACIAIS  
TÍPICAS

*Campinas*

*2011*

*TÂNIA KAWASAKI DE ARAUJO*

INVESTIGAÇÃO DOS GENES *TFAP2A* E *BMP4*  
EM INDIVÍDUOS COM FENDAS OROFACIAIS  
TÍPICAS

Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.

**Orientadora:** *Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes*

*Campinas  
Unicamp  
2011*

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

Ar15i Araujo, Tânia Kawasaki de  
Investigação dos genes *TFAP2A* e *BMP4* em indivíduos com fendas orofaciais típicas. /Tânia Kawasaki de Araujo -- Campinas, SP : [s.n.], 2011

Orientador : Vera Lúcia Gil da Silva Lopes  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fenda labial. 2. Sequenciamento de DNA. 3. Genética molecular. I. Lopes, Vera Lúcia Gil da Silva. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Molecular investigation of *TFAP2A* and *BMP4* genes in patients with cleft lip and palate**

**Keywords:** • Cleft lip  
• DNA sequencing  
• Molecular genetics

**Titulação: Mestre em Ciências Médicas**  
**Área de Concentração: Ciências Biomédicas**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes**  
**Prof. Dr. Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini**  
**Prof. Dr. Mônica Barbosa de Melo**

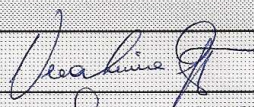
**Data da defesa: 25-02-2011**

*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.*

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**  
**Tânia Kawasaki de Araujo**

Orientador(a): Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

**Membros:**

1. Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes - 

2. Profa. Dra. Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini - 

3. Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo - 

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

**Data: 25/02/2011**

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente a Deus.*

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

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

*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, principalmente Marilza e Luciana, por todos os momentos que me auxiliaram durante estes dois anos.*

*A todos meus amigos do laboratório: Milena, Ilária, Gabi, Mailme, Renata, Tarsis, Marcelo, Simone, Renato, Fábio, Estela, Lidiane, Lucila, Rodrigo, Karina. Obrigada por sempre me ajudarem na realização deste trabalho e pelos bons momentos que passamos.*

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

*“Somos o que repetidamente fazemos. A  
excelência, portanto, não é um feito, mas um hábito”*

*Aristóteles*

# ***RESUMO***



A patogênese das fendas orais envolve tanto fatores genéticos como ambientais. Mutações que causam fenda labiopalatal (FL±P) em camundongos apontam diretamente para genes candidatos em humanos. Por exemplo, as FL±P foram descritas em modelos animais deficientes ou com mutações nos genes *TFAP2A* e *BMP4*, sendo que mutações neste último foram detectadas em casos de FL±P não síndrômica na população chinesa. Os dois genes citados também estão associados, em modelos animais, a alterações da morfogênese de outros órgãos. Objetivou-se investigar o envolvimento dos genes *BMP4* e *TFAP2A* na etiologia da FL±P em uma amostra de pacientes brasileiros por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), digestão com enzima HphI (PCR-RFLP) e sequenciamento direto. A casuística foi composta por 45 indivíduos, classificada, clinicamente, de acordo com a *International Clearinghouse for Birth Defects and Surveillance and Research* (ICBDSR 2007). Com a finalidade de comparar com a literatura, utilizou-se a divisão em dois grupos: FL±P síndrômica (20 casos), FL±P não síndrômica (25 casos). A análise estatística foi feita com o teste do qui-quadrado. A substituição 538T→C (rs17563) no gene *BMP4*, anteriormente descrita como associada à FLP na população chinesa e em alguns indivíduos com microforma de FLP, foi encontrada em 34 (75,5%) indivíduos. Utilizou-se grupo controle de 169 indivíduos normais, sem casos de fendas orofaciais em três gerações e sem ascendência oriental. Não houve diferença significativa na frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo rs17563 no gene *BMP4* entre os casos com FL±P e o grupo controle ( $p=0,3347$ ,  $OR=0,718255$ ,  $95\%CI$ ,  $0,4-1,27$ ). Entretanto, para que a análise estatística seja conclusiva, é necessário aumento do número amostral. Alterações de sequência no gene *TFAP2A*, descritas como polimorfismos em base de dados genômicos,

foram identificadas em cinco casos. Deste modo, não existem evidências de que os genes *TFAP2A* e *BMP4* estejam envolvidos na gênese de FL±P nesta amostra.

# ***ABSTRACT***

Information regarding research throughout the years shows that the pathogenesis of cleft lip and palate (CL±P) involves genetic and environmental factors. Mutations that cause CL±P in mice point directly to candidate genes in humans, as *TFAP2A* and *BMP4* gene. The phenotype of animal models with mutations in these genes included clefts. Mutations in *BMP4* have also been detected in cases of nonsyndromic CL±P in the Chinese population. Considering this, the aim of our study is to investigate the involvement of *BMP4* and *TFAP2A* genes in the etiology of CL±P in the Brazilian population. Mutation screening by direct sequence and enzyme digestion with HphI (PCR-RFLP) were applied. Casuistry was composed by 45 patients, clinically classified by *International Clearinghouse for Birth Defects and Surveillance and Research* (ICBDSR 2007). To compare with the literature, they were divided in syndromic CL±P (20 cases) and nonsyndromic CL±P (25 cases). Statistical analysis was performed using the chi square. The sample included 45 individuals, separated into two groups: The substitution 538T → C (rs17563) in the *BMP4* gene, previously described as associated with CL±P in the Chinese population and in some individuals with microforms of CLP was found in 34 (75.5%) subjects. A control group of 169 normal subjects, which had no cases of orofacial clefts in three generations and no Oriental ascendancy, was used. There was no significant difference in frequency of genotypes and alleles of rs17563 polymorphism in the gene *BMP4* between cases with CL ± P and the control group (p = 0.3347, OR = 0.718255, 95% CI, 0.4 to 1.27). However, further studies with larger samples are necessary to elucidate this aspect. At *TFAP2A* gene was detected two single nucleotide polymorphisms. Thus, there is no evidence of involvement of *TFAP2A* and *BMP4* genes in the CL±P in this sample.

# *LISTA DE ILUSTRAÇÕES*

## TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene <i>BMP4</i> . G: ciclo gradiente. ....	<b>80</b>
<b>Tabela 2.</b> Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene <i>TFAP2A</i> . G: ciclo gradiente. ....	<b>80</b>
<b>Tabela 3.</b> Componentes e volumes utilizados nas reações de sequenciamento.....	<b>83</b>
<b>Tabela 4.</b> Componentes e volumes utilizados nas reações de sequenciamento no ABI 3130. ....	<b>84</b>
<b>Tabela 5.</b> Primers, enzima de restrição, e tamanho dos fragmentos para o <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNP) rs17563 no gene <i>BMP4</i> . ....	<b>88</b>
<b>Tabela 6.</b> Resumo do polimorfismo observado no gene <i>BMP4</i> . ....	<b>92</b>
<b>Tabela 7.</b> Resumo dos polimorfismos observados no gene <i>TFAP2A</i> .....	<b>94</b>
<b>Tabela 8.</b> Distribuição dos genótipos e alelos do SNP rs17563 em pacientes e controles. ....	<b>97</b>

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desenvolvimento facial. Os dois processos mandibulares (cinza escuro), os dois processos maxilares (cinza claro) e o processo frontonasal. Durante a quarta semana de gestação o processo mandibular funde-se na linha média para formar o maxilar inferior. Seguida da formação dos placodes nasais, os processos nasais lateral e medial desenvolvem dentro do processo frontonasal. Durante a sexta e sétima semana o processo nasal medial se funde com cada um e com o processo maxilar (37). ....	<b>49</b>
--	-----------

<b>Figura 2.</b> Estrutura do gene <i>BMP4</i> : em vermelho a porção traduzida e em azul a porção não traduzida do exon. ....	<b>61</b>
<b>Figura 3.</b> Estrutura do gene <i>TFAP2A</i> : em vermelho a porção traduzida e em azul a porção não traduzida do último exon. ....	<b>64</b>
<b>Figura 4.</b> Ciclos utilizados na amplificação de todos os fragmentos. ....	<b>82</b>
<b>Figura 5.</b> Ciclos utilizados na reação de seqüenciamento. ....	<b>83</b>
<b>Figura 6.</b> Ciclos utilizados na reação de seqüenciamento no ABI 3130. ....	<b>85</b>
<b>Figura 7.</b> Demonstrativo de amplificação dos fragmentos dos genes <i>TFAP2A</i> e <i>BMP4</i> . M: marcador de peso molecular 100pb. ....	<b>91</b>
<b>Figura 8.</b> Substituição T → C, exon 5 do gene <i>BMP4</i> (rs17563). ....	<b>92</b>
<b>Figura 9.</b> Substituição G → T, exon 15 do gene <i>TFAP2A</i> (rs2230116). ....	<b>93</b>
<b>Figura 10.</b> Substituição C → T, exon 15 do gene <i>TFAP2A</i> (rs3734391). ....	<b>93</b>
<b>Figura 11.</b> Demonstrativo de amplificação do fragmento do exon 5 do gene <i>BMP4</i> . M: marcador de peso molecular 100pb. ....	<b>95</b>
<b>Figura 12.</b> Ensaio de PCR-RFLP para análise do polimorfismo 538 T → C do gene <i>BMP4</i> . Produtos de PCR forma digeridos com a enzima HphI e separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Linha 1: genótipo homozigoto CC mostrando apenas um fragmento de 424pb; linha 2: genótipo heterozigoto TC mostrando três fragmentos de 424pb, 229pb e 195pb; linhas 3,4: genótipo homozigoto TT mostrando dois fragmentos de 229pb e 195pb; linha M: marcador de peso molecular 100pb. ....	<b>96</b>

# ***LISTA DE ABREVIATURAS***



**Ala:** alanina

**Asn:** asparagina

**BMP4:** *Bone Morphogenetic Protein 4*

**BMP7:** *Bone Morphogenetic Protein 7*

**Del:** Deleção

**DMSO<sub>4</sub>:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido desoxiribonucleico

**DNTP:** Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

**DLX:** *Drosophila distal-less homeobox*

**ECLAMC:** Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas

**EDTA:** Etilenediaminotetracetato dissódico 2H<sub>2</sub>O

**FCM:** Faculdade de Ciências Médicas

**FGF:** *Fibroblast growth factor*

**FGF8:** *Fibroblast growth factor 8*

**FGF18:** *Fibroblast growth factor 18*

**FGFR1:** *Fibroblast growth factor receptor 1*

**FGFR1:** *Fibroblast growth factor receptor 1*

**FGFR2:** *Fibroblast growth factor receptor 2*

**FGF10:** *Fibroblast growth factor 10*

**FL:** Fenda labial

**FP:** Fenda palatal isolada

**FLP:** Fenda labiopalatal

**FL±P :** Fenda labial com ou sem fenda palatal

**FOXE1:** *Forkhead box E1*

**FOT:** fenda orofacial típica

**GLI2:** *GLI family zinc finger 2*

**GSTT1:** *glutathione S-transferase theta 1*

**HGMD:** *Human Genome Mutation Database*

**HOXa-1:** *homeobox A1*

**HOXa-2:** *homeobox A2*

**HOXB-1:** *homeobox B1*  
**HOXB-3:** *homeobox B3*  
**HOXB-4:** *homeobox B4*  
**HphI:** *Haemophilus parahaemolyticus*  
**IRF6:** *Interferon regulatory factor 6*  
**LHX:** *LIM homeobox*  
**MgCl<sub>2</sub>:** Cloreto de Magnésio  
**MSX:** *muscle segment homeobox*  
**MSX1:** *msh homeobox 1*  
**MSX2:** *msh homeobox 2*  
**MTHFR:** *methylenetetrahydrofolate reductase*  
**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*  
**OMIM:** *Online Mendelian Inheritance in Man* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>  
**OTX:** *homeobox orthodentical*  
**pb:** pares de base  
**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*  
**PCR-RFLP:** *Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction*  
**PMX:** Proeminências maxilares  
**PNM:** Proeminências nasais mediais  
**PNL:** Proeminências nasais laterais  
**PolyPhen:** *Polymorphism Phenotyping*  
**SATB2:** *SATB homeobox 2*  
**SHH:** *sonic hedgehog*  
**SIFT:** *Sorting Intolerant from Tolerant*  
**SKI:** *v-ski sarcoma viral oncogene homolog*  
**SNP:** *single nucleotide polymorphism*  
**SPRY:** *sprouty*  
**Taq:** *Thermus aquaticus*  
**TCLE:** termo de consentimento livre e esclarecido  
**TFAP2A:** *transcription factor AP-2 alpha*

***TGFB1:*** *transforming growth factor, beta 1*

***TGFB3:*** *transforming growth factor, beta 3*

**Thr:** Treonina

**UNICAMP:** Universidade Estadual de Campinas

**UV:** ultravioleta

**Val:** valina

# *SUMÁRIO*

<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>xxi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xxvii</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>1. ASPECTOS GERAIS.....</b>	<b>45</b>
<b>2. DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL.....</b>	<b>48</b>
<b>2.1. Desenvolvimento do lábio.....</b>	<b>50</b>
<b>2.2. Desenvolvimento do palato.....</b>	<b>51</b>
<b>3. BASE EMBRIOLÓGICA DA FENDA LABIAL E FENDA PALATAL.....</b>	<b>53</b>
<b>4. FATORES ETIOLÓGICOS DAS FENDAS LABIOPALATAIS.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1. Fatores ambientais .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2. Fatores genéticos .....</b>	<b>56</b>
<b>4.2.1. Expressão inicial dos genes embrionários e moléculas sinalizadoras no desenvolvimento .....</b>	<b>56</b>
<b>4.2.2. Fatores genéticos em modelos animais.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.3. Fatores genéticos em humanos .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.4. Gene <i>BMP4</i>.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2.5. Gene <i>TFAP2A</i>.....</b>	<b>64</b>
<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>67</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>71</b>
<b>1. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>73</b>
<b>2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>73</b>
<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>75</b>

1. CASUÍSTICA.....	77
2. MÉTODOS.....	78
2.1. Obtenção das amostras.....	79
2.2. Sequenciamento automático dos genes candidatos: <i>BMP4</i> e <i>TFAP2A</i> .....	79
2.2.1. Desenho dos oligonucleotídeos .....	79
2.2.2. Amplificação dos fragmentos de interesse .....	81
2.2.3. Condições das reações de PCR.....	82
2.2.4. Sequenciamento automático .....	82
2.2.4.1. Sequenciador MegaBACE™ 1000 .....	83
2.2.4.2. Sequenciador ABI 3130 .....	84
2.2.5. Análise <i>in silico</i> .....	85
2.3. <i>Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain Reaction</i> (PCR-RFLP) do gene <i>BMP4</i> .....	87
2.3.1. Análise Estatística.....	88
RESULTADOS.....	89
1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES DOS GENES CANDIDATOS <i>TFAP2A</i> E <i>BMP4</i> .....	91
1.1. Amplificação dos fragmentos .....	91
1.2. Sequenciamento automático.....	91
1.3. Análise <i>in silico</i> .....	94
2. <i>RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORFISM-POLIMERASE CHAIN</i> <i>REACTION</i> (PCR-RFLP) DO GENE <i>BMP4</i> .....	95
2.1. Amplificação do fragmento .....	95
2.2. Digestão com enzima.....	95
DISCUSSÃO .....	99
CONCLUSÕES.....	105

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>127</b>
<b>1. ANEXO I Parecer do Comitê de Ética.....</b>	<b>129</b>
<b>2. ANEXO II Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>131</b>
<b>3. ANEXO III 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) .....</b>	<b>136</b>
<b>3. ANEXO IV Dados Clínicos dos Indivíduos.....</b>	<b>138</b>
<b>4. ANEXO V Protocolo de Extração de DNA pelo método Fenol-Clorofórmio .....</b>	<b>143</b>
<b>5. ANEXO VI Componentes e volumes das reações de PCR para a amplificação dos exons do gene <i>BMP4</i> .....</b>	<b>144</b>
<b>6. ANEXO VII Componentes e volumes das reações de PCR para a amplificação dos exons do gene <i>TFAP2A</i> .....</b>	<b>146</b>

# ***INTRODUÇÃO***



## 1. ASPECTOS GERAIS

As fendas orofaciais compõem um grupo heterogêneo de anomalias, que pode ser dividido em dois grandes grupos: as fendas orofaciais típicas (FOT), também chamadas de fendas orais, que são comuns e incluem as fendas labiopalatais e palatais, e as fendas orofaciais atípicas que são raras e compreendem as fendas faciais transversais, as oblíquas e as fendas do lábio inferior, entre outras classificadas por Tessier em 1976 (1,2).

Tradicionalmente, as FOT são um grupo de anomalias composto por duas entidades distintas: fenda labial com ou sem fenda palatal (FL±P) e fenda palatal isolada (FP). Entretanto, existem evidências da existência de fenda labial isolada, determinada por genes específicos (3). As FOT podem ser classificadas anatomicamente como aquelas que incluem apenas o palato secundário (o palato duro e mole chamada fenda palatal isolada) e os que envolvem o palato primário e englobam uma fenda de lábio com ou sem o palato (4).

Portanto, a fenda orofacial típica é uma malformação caracterizada por uma separação incompleta entre as fossas nasais e orais, ou seja, é derivada de uma embriopatia com a falha da: (1) fusão das proeminências nasais mediais e maxilares (fenda labial – FL; MIM 119530) ou (2) fusão dos processos palatais (fenda palatal – FP; MIM 119540). Alguns pacientes têm ambas as FL e FP (FLP; MIM 119530) (4).

A incidência das FOT é estimada em 1/500-2500 nascidos vivos em diferentes populações, variando com a localização geográfica, grupo étnico e condições socioeconômicas (5-9). Populações de ascendência americana ou asiática têm a maior prevalência de FOT nos nascimentos (5,10,11).

Na América Latina, segundo dados do ECLAMC (Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas), a incidência de fenda labiopalatal é de 11,5/10.000 nascimentos (1/850) e a incidência de fenda palatal isolada é de 3,9/10.000 nascimentos (1/2500) (12). Além disso, há uma incidência duas vezes maior no sexo masculino do que no feminino, sendo frequentemente unilateral, no lado esquerdo da face (5,13,14).

As fendas labiopalatais podem ocorrer como uma anomalia isolada, como parte de uma seqüência, ou dentro de um quadro de anomalias congênitas múltiplas (ACM). Nos casos de ACM, a fenda pode ser encontrada em síndromes monogênicas conhecidas, associações, ou em quadros de ACM sem etiologia conhecida. Apesar dessa classificação feita por alguns autores, a grande maioria das publicações científicas, inclusive os estudos genéticos, divide as FOT apenas em síndrômicas e não-síndrômicas (15). Entretanto, mesmos nestes estudos não há consenso sobre a investigação ou menção a exame físico dismorfológico, o que pode gerar dificuldade na correta interpretação dos resultados.

As FOT síndrômicas apresentam, muitas vezes, padrões de herança mendeliana e, portanto, favoráveis à identificação de causas genéticas (6). Embora várias síndromes mendelianas raras incluam FL±P entre seus sinais clínicos, a maioria dos casos de FL±P são não síndrômicos e não mendelianos (5,16,17). Aproximadamente, 70% dos casos das FOT são não síndrômicos; estes são caracterizados por FL±P sem anomalias associadas (3,8,16).

Grande parte dos casos de FL±P ocorre de forma esporádica, mas em algumas famílias há recorrência e até observa-se um padrão de herança mendeliana (16). Dessa maneira, as FL±P podem ser classificadas como esporádica ou familiar.

Apesar da patogênese da FL±P ser complexa e multifatorial (6,16,17,18), a importância dos fatores genéticos tem sido cada vez mais reconhecida, o que pode ser comprovado pelos resultados de alta agregação familiar, taxas de riscos de recorrência e elevação nas taxas de concordância de gêmeos monozigóticos quando comparadas aos dizigóticos (19). Por exemplo, em gêmeos com FL±P, a concordância é muito maior nos gêmeos monozigóticos (40%) do que nos gêmeos dizigóticos (4,2%). Em gêmeos com fenda palatal, a concordância também é maior em gêmeos monozigóticos (35%) do que nos gêmeos dizigóticos (7,8%) (20).

A FL±P e a FP foram consideradas entidades separadas baseado em razões genéticas e de desenvolvimento (6,21,22). Os genes e fatores ambientais são largamente desconhecidos em FL±P. Em contraste com fenda do palato secundário isolado para os quais muitas mutações são conhecidas, apenas algumas mutações em camundongos são conhecidas por causar FL±P. As fendas labiais e palatais ocorrem juntas em aproximadamente 45% dos casos (23).

É importante ressaltar que as FOT variam em suas características, podendo apresentar maior ou menor gravidade. Assim, o tratamento multidisciplinar é muitas vezes necessário e pode incluir cirurgia craniofacial, tratamento odontológico e ortognático especializado, intervenção auditiva e de fala, avaliação e intervenção educacional, psicológica e social (23)

As FOT são um problema significativo de saúde pública devido à morbidade significativa ao longo da vida e da etiologia complexa desses transtornos. Além do aspecto estético, as complicações que afetam a sucção e alimentação, a fala e o desenvolvimento psicológico do indivíduo afetado enfatizam a importância da compreensão das causas de FL±P para aperfeiçoar o planejamento do tratamento, prever a evolução em longo prazo de qualquer indivíduo afetado em desenvolvimento, melhorar a estimativa do risco de recorrência e realizar o aconselhamento genético (23).

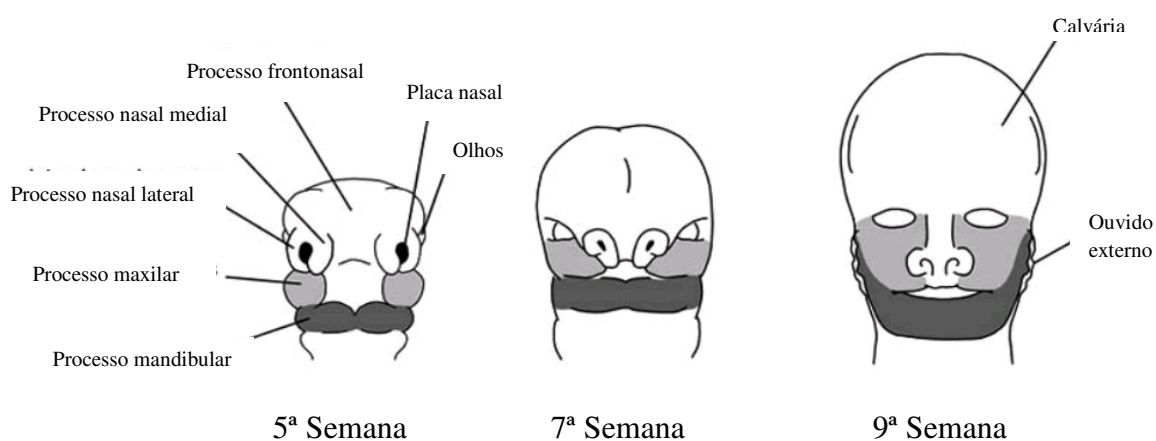
## 2. DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL

O complexo craniofacial primitivo se forma durante a 4ª semana pós-concepção após a migração do tecido da crista neural, precoce alargamento crânio-caudal da vesícula do cérebro e dobra tronco-lateral do disco trilaminar. A dobra do disco trilaminar ajuda a incorporar a endoderme no corpo, o que forma em parte a cavidade oral primitiva. Vários eventos indutivos entre o prosencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo e tecido da crista neural, que migra para o complexo craniofacial e aparelho do arco da faringe, ajudam a formar as cinco proeminências faciais (26-32). 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 neuroectodérmicas 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 (33,34). Assim o mesênquima facial é de origem da crista neural. O endotélio vascular e muscular, no entanto, são de origem mesodérmica.

Existem cinco proeminências durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário que compõem a face dos vertebrados: frontonasal, nasal medial, nasal lateral, maxilar e mandibular (Figura 1) (35). As proeminências maxilares, derivadas a partir do primeiro arco faríngeo, contribuem para os lados da face, lábios e do palato secundário (36).



**Figura 1:** Desenvolvimento facial. Os dois processos mandibulares (cinza escuro), os dois processos maxilares (cinza claro) e o processo frontonasal. Durante a quarta semana de gestação o processo mandibular funde-se na linha média para formar o maxilar inferior. Seguida da formação dos placóides nasais, os processos nasais laterais e mediais desenvolvem dentro do processo frontonasal. Durante a sexta e sétima semana o processo nasal medial se funde com cada um e com o processo maxilar (37).

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 *homeobox* regulatórios (*HOXA-1- homeobox A1*, *HOXA-2- homeobox A2*, *HOXB-1- homeobox B1*, *HOXB-3- homeobox B3*, e *HOXB-4- homeobox B4*), o gene *OTX* (*homeobox orthodentical*),

genes *DLX* (*Drosophila distal-less homeobox*), genes *MSX* (*muscle segment homeobox*), genes *LHX* (LIM homeobox) (31,32).

## **2.1. Desenvolvimento do lábio**

Parte do desenvolvimento do lábio superior e nariz iniciam-se no final da 4<sup>a</sup> semana de gestação humana ou no início do décimo dia de gestação (GD) em camundongos (37). As proeminências medial e lateral de cada uma das placas nasais, áreas cujo mesênquima é derivado do prosencéfalo e de células da crista neural (38), crescem para se tornar proeminências projetando-se frontalmente, rodeando um par de sulcos nasais, que irão se desenvolver em narinas. Isto ocorre em GD10-11 nos embriões de camundongo e na 5<sup>a</sup> semana em humanos (24,39). Ao mesmo tempo, a região dorsal do primeiro arco branquial do crânio expande frontalmente abaixo da região de desenvolvimento do olho para formar a proeminência maxilar, enquanto a região ventral e mais caudal do primeiro arco torna-se o maxilar inferior (38,40).

As proeminências nasais mediais (PNM), proeminências nasais laterais (PNL), e proeminências maxilares (PMX) sofrem um crescimento direcional para convergirem e se fundirem em três vias de junção. Na superfície externa no camundongo, as PNM e PNL parecem se encontrar em primeiro lugar, seguida pela reunião das PNM e PMX (24), e o contato na área interna do sulco nasal é entre a PNM e PNL. Na superfície externa, em humanos, as PNM e PMX parecem se encontrar em primeiro lugar, na parte frontal dos

sulcos nasais, seguida pela reunião das PNM e PNL e na área interna do sulco nasal (25,39).

## **2.2. Desenvolvimento do palato**

O palato é formado pela união de três elementos: o palato primário pelos processos frontonasal, e o palato secundário pelos dois processos maxilares laterais.

O palato primário é definido como a parte do primórdio facial que, inicialmente, separa a cavidade oral e nasal e inclui partes dos processos nasais mediais e laterais, do processo frontonasal e parte do processo maxilar que contribuem para a separação das cavidades (30,31,40). 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 placóide olfativo em desenvolvimento com a rápida proliferação do epitélio lateral e mesênquima subjacente.

Esses eventos são controlados em parte por genes da família das *FGFs* (*fibroblast growth factor*) (*FGF8* - *fibroblast growth factor 8* e *FGFR2* - *fibroblast growth factor receptor 2*), proteínas morfogenética óssea (*BMP4*-*bone morphogenetic protein 4* e *BMP7*-*bone morphogenetic protein 7*), *SHH* (*sonic hedgehog*) e ácido retinóico (31,41,42).

O desenvolvimento do palato secundário se inicia mais tarde, sendo na sexta a sétima semana em humanos e em GD12-15 em ratos (4,37). As prateleiras palatais desenvolvem verticalmente, elevam a uma posição horizontal, fazem contato e se fundem (4,43).

O palato secundário é definido como a parte do primórdio facial posterior ao palato primário e inclui os dois processos palatais laterais que se projetam medialmente para os processos maxilares. 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 das prateleiras palatais, sendo a coordenação do crescimento entre os processos e a apoptose ao longo da margem medial do epitélio das prateleiras palatais (30,31 41) eventos criticamente cronometrados.

Durante a oitava semana pós-concepção, as prateleiras palatais giram a partir de uma posição vertical em torno da língua e elevam em aproximação horizontal (30,31,41), com um ligeiro atraso neste processo observado em embriões do sexo feminino (44). A rápida elevação da prateleira palatal resulta de uma série de mecanismos que podem estar relacionados com a expressão dos genes *FGF8* e *SHH* ao longo da borda medial da proeminência maxilar (31). Uma vez que as prateleiras palatais são elevadas e aproximadas, elas se aderem na superfície de contato, sendo a fusão na costura ao longo das bordas mediais e a apoptose do epitélio mecanismos essenciais para o desenvolvimento normal do palato secundário.

É também observada expressão aumentada de moléculas de adesão celular como *TGF- $\beta$ 3* e *caderina-N* ao longo da margem medial das prateleiras palatais, sendo que as mesmas podem causar apoptose e diferenciação epitelial (30, 31, 45,46).



### 3. 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 FL±P. Fatores genéticos e ambientais que inibem o fluxo de células da crista neural ou diminuem o seu número podem afetar as massas celulares, tornando o contato entre as proeminências faciais inadequado ou impossível. 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 labial.

Assim, a fenda labial resulta da falha da fusão da PNM com a PMX e da PNL, resultando em uma lacuna, lateral a linha mediana, estendendo-se até o lábio superior e maxilar na narina (24,30,36,41,42,39,47,48). As fendas podem ser unilaterais ou bilaterais. Os estudos genéticos em populações humanas têm demonstrado que a FP e FL±P têm origens genéticas distintas (4).

Algumas estruturas adicionais que podem ser afetadas por fenda palatal são: a dentição, o osso alveolar e basal do palato primário e a musculatura labial. Indivíduos com fenda de palato primário podem apresentar deslocamento dental, agenesia dentária ou hipoplasia do pré-maxilar (30).

As fendas palatais podem resultar de defeitos primários na palatogênese ou podem ser secundárias aos distúrbios em outras estruturas craniofaciais. Os defeitos primários incluem o crescimento deficiente dos processos palatais, falha da elevação dos

processos palatais, falha da fusão dos processos palatais e ruptura de pós-fusão nas prateleiras (4,43).

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 processos palatais pelo tamanho ou posicionamento anormal da língua (9,23). Em alguns casos a micrognatia é um fator que pode inibir a elevação dos processos palatais, como pode ocorrer, por exemplo, na seqüência de Robin (49).

Além disso, a fenda palatal resulta em uma comunicação com a cavidade nasal e é um defeito de linha média relevante. Defeitos do palato secundário são expressos morfologicamente como falhas de elevação, falhas de contacto e adesão, ou falhas de fusão, resultando em fendas (30,31,41,42).

#### **4. FATORES ETIOLÓGICOS DAS FENDAS LABIOPALATAIS**

Fendas orais podem ocorrer como parte de síndromes mendelianas, como parte do fenótipo resultante de anomalias cromossômicas, ou como o resultado de exposição pré-natal a certos teratógenos. Em mais de 300 síndromes que possuem fenda oral como parte do fenótipo, cerca de metade destas é devido à herança mendeliana de um único locus genético. Muito progresso tem sido feito nos últimos anos 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 (32,50). É importante citar que a maioria das FL±P é isolada e considerada um traço complexo, uma

vez que o desenvolvimento craniofacial normal resulta da interação de muitos genes reguladores e, possivelmente, de fatores ambientais envolvendo, assim, fatores ambientais e genéticos (6,16,18,22).

#### **4.1. Fatores ambientais**

A contribuição de fatores ambientais na etiologia das fendas orais é sugerida por diversos estudos. Alguns teratógenos humanos estão associados a fendas labiopalatais, entre eles: álcool etílico, trimetadiona, retinóides, aminopterina, ácido valpróico, talidomida e drogas anticonvulsivantes, como a fenitoína. (16,18,51,52).

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.

O tabagismo materno durante a gestação também parece estar correlacionado com FL±P, (18,20,53,54) especialmente se o embrião tem uma deficiência genotípica *GSTT1* (*glutathione S-transferase theta 1*) (55). O genótipo materno *MTHFR* (*methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)*) pode afetar o risco de FL±P, mas os estudos são inconsistentes (3,55,56,57). Desse modo, observa-se que há interação de fatores genéticos com ambientais.

## 4.2. Fatores genéticos

### 4.2.1. Expressão inicial dos genes embrionários e moléculas sinalizadoras no desenvolvimento

Para entender o desenvolvimento patológico, é fundamental entender os mecanismos do desenvolvimento normal. 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 (30).

Os fatores de crescimento estimulam a proliferação celular, diferenciação e permeabilidade através de dois mecanismos gerais. Um destes mecanismos envolve certos fatores de crescimento (por exemplo, esteróides, ácido retinóico, e tiroxina) que atravessam a membrana plasmática, ligando-se a receptores específicos, e agindo diretamente sobre os genes para controlar a função dos mesmos. O segundo mecanismo envolve alguns fatores de crescimento (por exemplo, fatores de crescimento de fibroblastos (*FGFs*) e fator de crescimento epidérmico) que se ligam à superfície de células receptoras específicas, ativando os caminhos de sinalização intracelulares (por exemplo, Smad, MAP-quinase) e, eventualmente, causando ativação do gene por mecanismos parácrinos (31).

A ativação direta do gene (o primeiro mecanismo) usa sinalização endócrina de “longa distância”, que é normalmente mais sistêmica, potente, de maior duração e menos suscetível à interrupção comparada com sinalização de “curta distância” e parácrina. Os fatores de crescimento e as moléculas que atuam através do sistema de sinalização

endócrino são tipicamente morfogenes poderosos e indutores mais potentes de malformações craniofaciais (31).

Muitas moléculas de sinalização e seus receptores podem ser substituídas por outras moléculas e estão presentes ao longo da vida. Elas mudam sua função na presença de diferentes concentrações ou classes de fatores de crescimento ou receptores (30,31). Essa redundância pode ser explicada, em parte, pela “plasticidade de desenvolvimento” observada durante a embriogênese (31).

O mecanismo de controle gênico, a indução de migrações celulares realizada por fatores de crescimento e a fusão entre as células são essenciais para a organogênese e o desenvolvimento embrionário normal (30,58). Consequentemente, interrupções nesses processos resultam em morte embrionária ou malformações congênitas (30,31,41).

#### **4.2.2. Fatores genéticos em modelos animais**

Modelos animais têm provado ser muito úteis na identificação de mutações genéticas responsáveis por malformações congênitas em humanos (22). 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 (24,25).

Somente parte das mutações que determina fenda do palato secundário isolado em humanos está presente em camundongos, sendo que a expressão fenotípica nesses é mais complexa. Por outro lado, existem modelos de camundongos com FL±P não

sindrômica que se assemelham aos humanos com FL±P, tanto em complexidade genética como em interação ambiental (50). Desse modo, mutações que causam FL±P em camundongos apontam diretamente para genes candidatos para FL±P em humanos e indiretamente, para vários genes relacionados a mecanismos que podem levar a FL±P. Todavia, a maioria destes genes candidatos não tem sido analisada em casos humanos (59).

Camundongos mutantes para os genes *FGF10*, *FGF18*, ou *FGFR1* têm FP, mas não apresentam FL±P (60). Por outro lado, em camundongos mutantes para o gene *IRF6* (61,62) e *MSX1* (63) foram detectadas apenas FL±P, e não FP.

A revisão de Juriloff e Harris (59) indicou sete outros genes candidatos para FL±P em humanos, *BMP4*, *BMPR1B*, *SOX4*, *SP8*, *TFAP2A*, *WNT3* e *WNT9B*, conforme a descrição de modelos animais com fenda e resultados positivos em estudos de ligação. São genes que codificam fatores de transcrição ou participam da sinalização celular e são expressos durante o desenvolvimento craniofacial, inclusive durante o desenvolvimento do lábio e do palato.

#### **4.2.3. Fatores genéticos em humanos**

As FL±P são observadas como parte do fenótipo de uma ampla variedade de tipos de rearranjos cromossômicos, incluindo trissomias, duplicações, deleções, microdeleções ou rearranjos críticos. Rearranjos que podem incluir fenda do palato primário incluem deleções de 4p (síndrome de Wolf-Hirschhorn) 4q ou 5p (síndrome do *Cri-du-chat*); duplicações de 3p, 10p, 11p e trissomia do cromossomo 13 ou 18 (e trissomia do

cromossomo 9 em mosaico) (64,65,66). Já fenda do palato secundário é uma característica frequente na Síndrome Velocardiofacial (microdeleções de 22q11.2) (49).

Uma vez que FL±P é uma malformação congênita bastante heterogênea, diferentes regiões cromossômicas como 1q, 2p, 4q, 6p, 14q, 17q, e 19q têm sido pesquisadas por conter genes possivelmente envolvidos na gênese de FOT. Portanto, pode-se sugerir que estes *loci* estariam envolvidos de alguma forma na gênese desta malformação, e que os diferentes resultados obtidos por muitos grupos de pesquisa seriam devido a diferenças genéticas nas populações investigadas (20,50,65,67-75).

Dentre os genes expressos durante o desenvolvimento craniofacial e palatal e associados à FL±P estão genes que codificam fatores de transcrição (genes *IRF6*, *FOXE1*, *MSX1*, *TP63*, *TBX22*), fatores de crescimento (gene *TGFA*), fatores e receptores de crescimento de fibroblasto (genes *FGF8* e *FGFR1*), fatores de crescimento transformador (gene *TGFB3*), genes de sinalização celular (genes *MTHFR* e *RARA*) e genes que codificam moléculas de adesão celular (gene *PVRL1*) (6,32,60,76,77,78,79).

Alguns genes parecem contribuir para a ocorrência de FL±P. O gene *IRF6* contribui com 12% dos casos, os genes *FOXE1*, *GLI2*, *MSX2*, *SKI*, *SATB2*, *SPRY* colaboram com 6% e os genes *FGF8*, *FGFR1* com 3% dos casos, já o gene *MSX1* contribui com 2% dos casos de FL±P (77). Apesar de ter sido sugerido que vários genes têm um papel importante na etiologia das FL±P, eles na verdade representam apenas uma pequena proporção das etiologias reconhecidas (76).

O gene *IRF6* (região 1q32) pertence a uma família de nove fatores de transcrição que regulam a expressão de interferon-alfa e beta após infecção viral. Mutações

nesse gene foram descritas como causadoras das síndromes de Van der Woude e Pterígeo Poplíteo. Ambas as síndromes apresentam FL±P como uma de suas características (80). Mutações neste gene também foram associadas a casos de FL±P não-sindrômicas (72,81). Portanto, o gene *IRF6* tem um papel na etiologia de FL±P síndrômica e não síndrômica.

Mutações no gene *MSX1* (região 4p16) também causam FL±P ou FP como parte de uma síndrome (82) e as variantes deste também podem contribuir para uma pequena proporção dos casos de FL±P e FP não síndrômica (83,84). Do mesmo modo, Lidral *et al.* (74) concluíram que o gene *MSX1* está potencialmente envolvido na patogênese de fenda palatal. Suzuki *et al.* (85) e Vieira *et al.* (77) identificaram uma mutação *missense* no gene *MSX1* em pacientes vietnamitas e filipinos com FL±P, respectivamente.

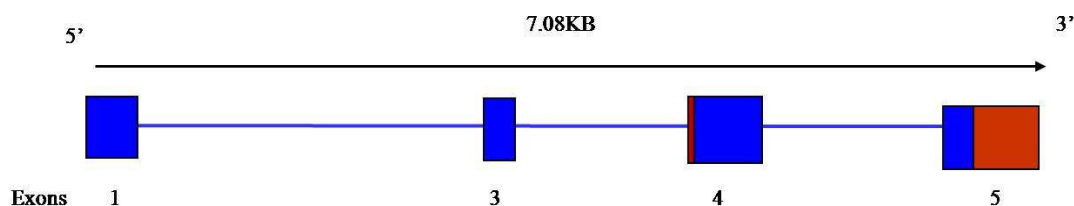
As variantes dos genes pertencentes à família *FGF* (*FGF3*, *FGF7*, *FGF10*, *FGF18*, ou *FGFR1*) também estão associados com FL±P ou FP não síndrômica, em pequenas proporções de casos de fenda em humanos (60).

Embora estudos anteriores tenham identificado SNPs em vários genes candidatos, que estão associados com FL±P não-sindrômica, incluindo *TGFA* (67,68), *TGFB3* (54), *MTHFR* (86), e *MSX1* (51,54), esses polimorfismos representam apenas uma pequena porcentagem do total de variância. Além disso, estudos sobre os efeitos do polimorfismo nestes genes tiveram resultados conflitantes em diferentes populações. Isto sugere que a associação entre polimorfismos e FL±P não-sindrômica pode variar, pois as populações possuem diferenças em suas constituições genéticas e/ou exposições ambientais.



#### 4.2.4. Gene *BMP4* (MIM 112262)

O gene *BMP4* (*Bone Morphogenetic Protein 4*), que está localizado no cromossomo 14q22-q23 humano, é um membro da superfamília do fator de crescimento transformador- $\beta$  (*TGF- $\beta$* ), caracterizada por moléculas de sinalização e que desempenham papéis essenciais no desenvolvimento embrionário (87,88). Este gene codifica um fator de crescimento extracelular necessário para a formação da mesoderme (88,89). O gene *BMP4* possui cinco exons (apenas os exons 4 e 5 são traduzidos) e apresenta três isoformas diferentes. A isoforma representada na figura 2 codifica uma proteína de 408 resíduos (88,89).



**Figura 2.** Estrutura do gene *BMP4*: em vermelho a porção traduzida e em azul a porção não traduzida do exon.

O gene *Bmp4* é amplamente expresso em embriões e adultos, no entanto, a perda de função do gene leva a uma letalidade embrionária precoce (90,91). O gene *Bmp4*, em camundongo, tem um número de papéis distintos no desenvolvimento embrionário, incluindo funções no desenvolvimento facial, através da regulação da proliferação celular, diferenciação, apoptose e quimiotaxia (88,89); na morfogênese cardíaca (96-97); no

desenvolvimento de membros (96,98), rins, olhos (98-101), pulmão (102), aparelho vestibular (103) e no desenvolvimento das estruturas craniofaciais (95).

Além disso, o gene *BMP4* pode ser detectado no ectoderma do primeiro arco faríngeo uma vez que o mesmo começa a se formar (104), e está envolvido na separação apoptótica dos arcos (105). Durante o desenvolvimento craniofacial, este gene é expresso no epitélio da borda, no ponto de fusão entre os processos nasal medial e maxilar (95,106,107).

A inativação tecido-específico do gene *Bmp4* revelou papéis adicionais para este gene em estágios posteriores da morfogênese do coração, como a septação do ventrículo, canal atrioventricular (93) e via de saída (94).

Numerosos estudos têm revelado que a sinalização do gene *BMP4* também é crítica para o desenvolvimento do olho durante a embriogênese (98,108-111).

Na face do embrião de camundongo, o gene *Bmp4* é expresso nas PNM, PNL (106,107) e PMX (95) antes do contato e da fusão, nas áreas que irão fundir estas três proeminências em conjunto. A maior expressão deste gene situa-se no ectoderma da metade posterior da fossa nasal. Durante a fusão, o gene *Bmp4* é expresso no ectoderma do local de contato e ventral à área de fusão. Após a fusão das proeminências faciais, a expressão do gene *Bmp4* diminui e parece se localizar no mesênquima da borda da fossa nasal (35).

Uma mutação condicional foi criada na qual o gene *Bmp4* é completamente inativado no epitélio e mesênquima da PMX no estágio de GD10.5, e parcialmente inativado no epitélio da PNL e PNM. A inativação é irreversível e, portanto, descendentes dessas células, como as da PMX que irão contribuir para o palato, também não expressam o

gene *Bmp4*. O mutante condicional do gene *Bmp4* demonstrou atraso bilateral da fusão das PNM e PMX e, mais tarde, cerca de 20% (2/9) tinham FL unilateral isolada. A penetrância incompleta da FL poderia ser devido à inativação incompleta do gene *Bmp4* no epitélio das PNM e PNL (95).

Experimentos de interferência no RNA (*knockdown*) do gene *Bmp4* causaram atraso no crescimento das PNM e PNL, mas posteriormente embriões foram recuperados e a fusão foi realizada novamente, talvez apontando a redundância dos mecanismos envolvidos neste processo (112).

Além disso, o gene *Tgfb2* é expresso de forma semelhante, mas seguindo um padrão mais restrito que o gene *Bmp4*, no ectoderma das bordas das PNM, PNL, e PMX, no local de fusão e durante a fusão (113). Mais tarde o gene *Bmp4* se manifesta no mesênquima no desenvolvimento do palato secundário, e os mutantes nulos para *Tgfb2* tinham baixa penetrância em FP, mas não em FL±P (114). Assim, pode-se especular que há redundância entre as funções dos genes *Bmp4* e *Tgfb2* durante a etapa de fusão no desenvolvimento do lábio superior.

O gene *TGFB2* (1q41) não parece estar implicado em FL±P em humanos, já que estudos de ligação ou associação não identificaram participação do mesmo na etiologia da FL±P (74,116). Entretanto, outros genes pertencentes à mesma família como *TGFB1* e *TGFB3*, provavelmente estão envolvidos, já que ambos parecem ser expressos anormalmente em pacientes com FL±P (116). Além disso, as regiões genômicas 14q24 (*TGFB3*) e 19q13(*TGFB1*) mostraram ligação ou sugestão de ligação para FL±P (115).

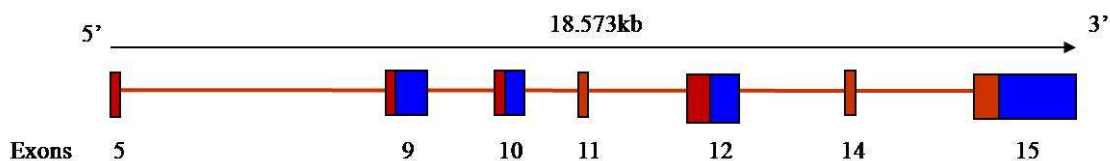
Lin *et al.* (117) mostraram que o polimorfismo rs17563 (538T→C) no gene *BMP4* contribui para o risco de FL±P não síndrômica em uma população de crianças chinesas.

Suzuki *et al.* (118) identificaram mutações *missense* no gene *BMP4* em indivíduos com FL±P não síndrômica, mas a frequência de mutação no gene *BMP4* nesses casos não foi significativamente maior do que nos controles.

Desse modo, há indícios de que o gene *BMP4*, localizado numa região que está implicada em risco de FL±P não síndrômica por estudos de ligação em humanos e por estudos em modelos animais (115), é um excelente gene candidato na etiologia de FL±P.

#### 4.2.5. Gene *TFAP2A* (MIM:107580)

O gene *TFAP2A* (*transcription factor AP-2 alpha*) codifica 21 isoformas diferentes, contém 16 exons e codifica um fator de transcrição do DNA (119,120). A isoforma representada na figura 3 codifica uma proteína de 439 resíduos.



**Figura 3.** Estrutura do gene *TFAP2A*: em vermelho a porção traduzida e em azul a porção não traduzida do exon.

Em camundongos, o gene *TFAP2A* é expresso em células da crista neural cranial e seus derivados, incluindo o mesênquima das PNM, PNL e PMX. Outras regiões embrionárias de expressão incluem os gânglios sensoriais, membros, região meso-metanéfrica e epiderme (121). Além disso, o gene *TFAP2A* tem expressão durante a embriogênese do olho, orelha, rosto, membros e tubo neural (91,122-125).

Camundongos mutantes com alelos nulos para o gene *TFAP2A* (91,122) desenvolvem uma grave síndrome letal incluindo fenda facial, ou aparente falta de boca e focinho, deficiência de ouvidos, olhos e de membros anteriores. Contudo, embriões quiméricos constituídos por células portadoras de alelos com mutações nulas para o gene *TFAP2A* e células isoladas normais são viáveis, mas possuem vários defeitos tais como FL±P (126).

O gene *TFAP2A* está localizado no cromossomo 6p24 humano, uma região implicada em estudos de associação de FL±P em humanos (72,127-129). Além disso, mutações no gene *TFAP2A* foram relatadas na síndrome branquio-óculo-facial, que inclui fenda labiopalatal como parte do fenótipo (130). Shi *et al.* (55) investigaram microdeleções em casos de fendas orais, em que foram genotipados 333 genes candidatos em 725 famílias de duas populações de ancestralidade escandinava, e identificaram entre outros achados, deleções envolvendo o gene *TFAP2A*.

O gene *TFAP2A* parece ser um excelente gene candidato na etiologia de FL±P em humanos. Entretanto, até o momento, não há estudos de triagem de mutações do gene *TFAP2A* em pacientes com FL±P.

## ***JUSTIFICATIVA***

Mutações que causam FL±P em camundongos indicam diretamente genes candidatos para FL±P humana e indiretamente, a vários genes candidatos relacionados. Estes também podem contribuir para o entendimento de mecanismos que podem levar à FL±P, uma vez que ainda existem várias lacunas para que se entendam os principais fatores envolvidos na formação do lábio e palato, que, se esclarecidas, poderiam contribuir para a busca de alternativas de prevenção de fenda oral. A maioria destes genes candidatos não foi analisada em casos humanos. Tendo em vista estes aspectos e os atuais conhecimentos dos genes *BMP4* e *TFAP2A*, justifica-se a análise de mutações nesses genes em indivíduos com FL±P.

## ***OBJETIVOS***



## 1. OBJETIVO GERAL:

Contribuir para o conhecimento etiológico da fenda labial com ou sem fenda palatal.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Investigar mutações no gene *BMP4* em indivíduos com fenda labial com ou sem fenda palatal.
2. Investigar mutações no gene *TFAP2A* em indivíduos com fenda labial com ou sem fenda palatal.

# ***CASUÍSTICA e MÉTODOS***

## 1. CASUÍSTICA

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM / UNICAMP (n° 714/2008) (Anexo I). O convite para participação neste estudo foi realizado para as famílias e indivíduos atendidos no Ambulatório de Dismorfologia Craniofacial do Hospital das Clínicas da UNICAMP, e também foi estabelecido contato com outros centros de genética vinculados ao Projeto Crânio-face Brasil, sediado no Depto de Genética Médica/ FCM / Unicamp e coordenado pela Dra Vera Lúcia Gil da Silva Lopes. Assim, após anuência do participante ou de seu responsável, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo II).

A casuística foi composta por indivíduos brasileiros com FL±P, previamente submetidos à avaliação genético-clínico e classificados como fendalabiopalatal isolada, de acordo com a *International Clearinghouse for Birth Defects and Surveillance and Research* (ICBDSR 2007) (131) (Anexo III). Indivíduos com ascendência oriental e indivíduos com fenda palatal isolada foram excluídos da amostra. Os dados clínicos dos indivíduos estão descritos no Anexo IV.

Para fim de comparação com a literatura, a amostra foi reclassificada em dois grupos de indivíduos com FOT e um grupo controle:

- Grupo 1: 25 casos de fendas labiopalatais não-sindrômicos.
- Grupo 2: 20 casos de fendas labiopalatais sindrômicos.

Foi constituído um grupo controle, formado por 169 indivíduos sem história de fenda labiopalatal ou palatal em três gerações e sem ascendência oriental. Esses indivíduos

foram voluntários, aceitos no estudo após heredograma realizado pela pesquisadora responsável ou por pesquisadores participantes deste estudo.

O grupo de casos com FL±P é composto por 24 indivíduos do sexo feminino e 21 indivíduos do sexo masculino, enquanto que o grupo controle foi composto por 91 indivíduos do sexo feminino e 78 indivíduos do sexo masculino.

Todos os indivíduos com FL±P incluídos neste estudo apresentam cariótipo normal, com resolução de 500 bandas (coloração GTG).

## 2. MÉTODOS

A proposta inicial foi de realizar seqüenciamento direto dos genes *BMP4* e *TFAP2A*. Entretanto, por problemas técnicos esta estratégia só pôde ser concluída para os primeiros 22 pacientes. Uma vez que foi observado um polimorfismo (rs17563) já associado à FL±P em outra população em vários pacientes da presente amostra, foi necessária mudança do foco inicial do trabalho. Assim, nos pacientes restantes (29 casos) e no grupo controle foi investigado apenas o genótipo do polimorfismo rs17563 através da técnica de PCR-RFLP. Por este motivo, a apresentação do método descreve todas as etapas laboratoriais.

## 2.1. Obtenção das amostras

Foram coletadas de 10 a 20 ml de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 1,0 ml de EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico 2H<sub>2</sub>O) 10 % pH 8,0 como anti-coagulante. Para obtenção das amostras de DNA genômico utilizou-se o método de extração fenol-clorofórmio descrito por Araújo *et al.* (132) (Anexo V).

## 2.2. Sequenciamento automático dos genes candidatos: *BMP4* e *TFAP2A*

### 2.2.1. Desenho dos oligonucleotídeos

Para a confecção dos pares de oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos dois genes candidatos foi utilizado o programa *Gene Runner*, seguindo as seguintes recomendações de Mc Pherson e Moller (133):

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

### Gene *BMP4*

Para a amplificação dos exons 4 e 5, os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se o programa *Gene Runner*. A sequência dos oligonucleotídeos, o tamanho dos fragmentos e as temperaturas de anelamento estão representados na tabela 1.

**Tabela 1.** Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *BMP4*. G: ciclo gradiente.

Exon	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Exon 4	sense: ACCTGCTTCCATCTTGC antisense: TGGGGCTTTGATGTAACC	600	G – 59
Exon 5.1	sense: CACCATTCATTGCCCAAC antisense: GGCAGTTCTTATTCTTCTCC	655	G - 54
Exon 5.2	sense: GTTACCTCAAGGGAGTGGG antisense: CTGTGTAGTGTGTGGGTGAGTG	558	G – 59

### Gene *TFAP2A*

Para a amplificação dos fragmentos de interesse, os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se o programa *Gene Runner*. A seqüência dos oligonucleotídeos, o tamanho dos fragmentos e as temperaturas de anelamento estão representados na tabela 2.

**Tabela 2.** Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *TFAP2A*. G: ciclo gradiente.

Exon	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)
Exon 1	sense: CATCACTTCCCAGGTCAGC antisense: CTGTCTTCGCTGTCTCCTG	430	G – 58
Exon 5	sense: GATTGTGGTACTGGCGAG antisense: CCCATTCTTAGGCACAGC	688	G – 54
Exon 6	sense: GGAGAGCTAGTCGTGTCATC antisense: GAGGAAGGGAGGGAAAGAG	625	G – 57
Exon 7	sense: GTGGTTCAAGTTCGGATG antisense: GCAAATGGAGAGGGTGTC	345	G - 56
Exon 9	sense: ATTTCCCACGCAGACTTG antisense: CCTCAAAACGTCCCTCAC	690	G - 56

<b>Exon 10</b>	<b>sense:</b> GATTATTTGCTGGAGGAGG <b>antisense:</b> ACCAACATACTGAAGGCTG	453	G - 56
<b>Exon 11</b>	<b>sense:</b> GGAAGTAGCAGAGCCACAG <b>antisense:</b> CTTGGCTCTACGCTCTTC	545	G - 58
<b>Exon 12</b>	<b>sense:</b> CCTCCTTTAAATGTCTTGGG <b>antisense:</b> TCAGGAAGTAATGGTCACGC	624	G - 58
<b>Exons 13 e 14</b>	<b>sense:</b> TGGAGGTTGGTGGATGAG <b>antisense:</b> GAGGAAAAAGATGGGAGC	592	G - 58
<b>Exon 15</b>	<b>sense:</b> CTGAGAGGAAAGAGAGAGAGAG <b>antisense:</b> AGTAGCAGCAGCAGGAAG	642	G - 58
<b>Exon 16</b>	<b>sense:</b> GGTGGAGGGAAGTAGAGTG <b>antisense:</b> GAGAATTGCTTGAACCCG	653	G - 59

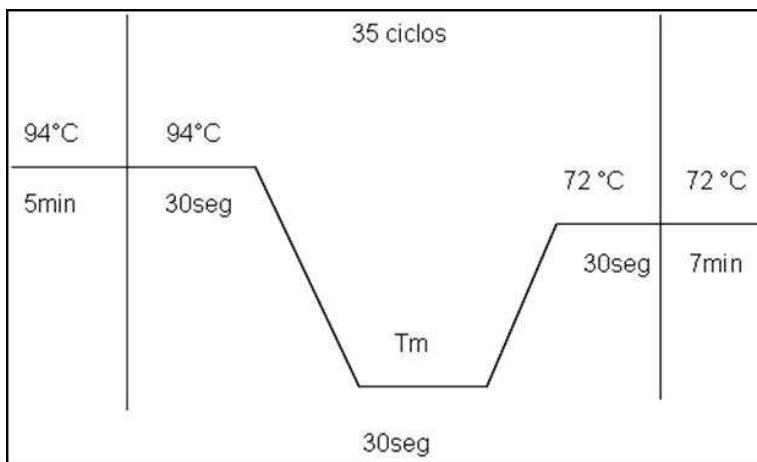
### 2.2.2. Amplificação dos fragmentos de interesse

A partir do DNA genômico, foi realizada a técnica de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos fragmentos de interesse. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%.

Para a padronização da amplificação dos fragmentos de interesse dos dois genes candidatos foram utilizados protocolos básicos já anteriormente estabelecidos em nosso laboratório, variando-se apenas a quantidade de cloreto de magnésio e DMSO. O protocolo para uma reação incluiu tampão (10X), MgCl<sub>2</sub> (25μM), dNTP (2μM), primer (5pmoles), DMSO, Taq DNA Polimerase (5U), DNA (200ng/μl) e água até completar o volume final de 15μL. Os componentes e volumes para a amplificação de cada exon encontram-se no anexo VI (Tabelas 1 a 3) e VII (Tabelas 1 a 9).

### 2.2.3. Condições das reações de PCR

As condições para a amplificação dos exons dos dois genes estão ilustradas na figura 4.



**Figura 4.** Ciclos utilizados na amplificação de todos os fragmentos.

### 2.2.4. Sequenciamento automático

Realizou-se sequenciamento automático direto em dois seqüenciadores (MegaBACE™ 1000 e ABI 3130). A utilização desses dois equipamentos se deve apenas a problemas técnicos ocorridos no seqüenciador MegaBACE™ 1000, sendo necessário a utilização de outra máquina para a continuidade da análise da amostra.



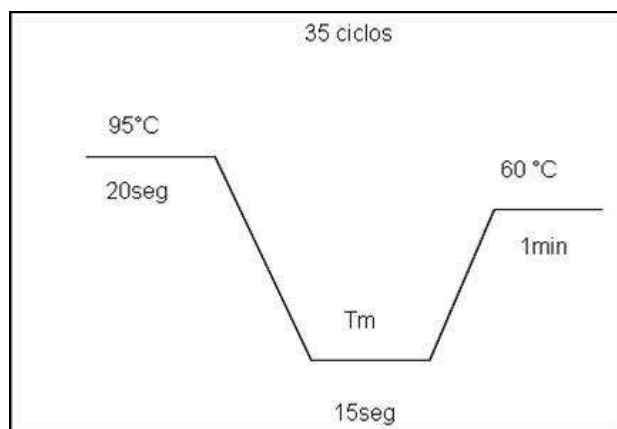
#### 2.2.4.1. Sequenciador MegaBACE™ 1000

Os fragmentos obtidos pela técnica de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) foram diretamente seqüenciados. Para tanto foi necessária uma purificação anterior com a enzima Exo-Sap (GETM). Utilizou-se o kit de sequenciamento para MegaBACE 1000 DYEnamic ET (Amersham Biosciences) para algumas amostras. Os componentes e volumes da reação estão representados na tabela 3.

**Tabela 3.** Componentes e volumes utilizados nas reações de sequenciamento.

Reagente	Volume
H <sub>2</sub> O	q.s.q. 10µl
Pré-mix	4,0µl
Primer	1,0µl
PCR tratado	2,0µl

As condições para a reação estão representadas na figura 5.



**Figura 5.** Ciclos utilizados na reação de sequenciamento.

Depois de prontas, as reações foram purificadas utilizando acetato de amônio e etanol, também para remover as impurezas que comprometeriam o sequenciamento.

As reações foram corridas em seqüenciador MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences) para a determinação da seqüência linear dos fragmentos amplificados.

Posteriormente, foi utilizado o programa *Chromas Lite*™ para análise e determinação da seqüência linear.

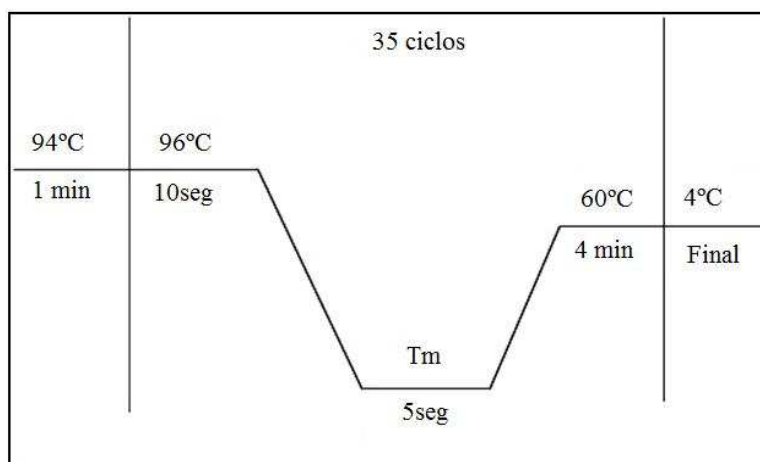
#### 2.2.4.2. Sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems)

Os fragmentos obtidos pela técnica de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) foram diretamente seqüenciados. Para tanto foi necessária uma purificação anterior com a enzima Exo-Sap (GETM). Utilizou-se *BigDye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) para as reações para o seqüenciador ABI 3130 (Applied Biosystems) para as outras amostras. Os componentes e volumes da reação estão representados na tabela 4.

**Tabela 4.** Componentes e volumes utilizados nas reações de seqüenciamento para o ABI.

<b>Reagentes</b>	<b>Volume</b>
Big Dye	1,0 µl
Tampão 5X	3,0 µl
PCR	2,0 µl
Primer	1,0 µl
H2O	4,0 µl

As condições para a reação estão representadas na figura 6.



**Figura 6.** Ciclos utilizados na reação de seqüenciamento no ABI 3130.

Depois de prontas, as reações foram purificadas utilizando isopropanol e etanol, também para remover as impurezas que comprometeriam o sequenciamento.

As reações foram corridas em seqüenciador ABI 3130 (Applied Biosystems) para a determinação da seqüência linear dos fragmentos amplificados.

Posteriormente, foi utilizado o programa *Chromas Lite*<sup>TM</sup> para análise e determinação da seqüência linear.

### 2.2.5. Análise *in silico*

As alterações que causam substituição de um único aminoácido na seqüência protéica, ou seja, não sinônimas, podem ou não modificar a estrutura e a função da proteína. A utilização de algoritmos computacionais pode ajudar na estimativa dessas informações (134). Foram utilizados dois testes *in silico*, escala *Grantham* e algoritmo

*PolyPhen*, para a análise de uma alteração não sinônima observada. O nível de concordância entre os resultados desses testes é de 88,1% (134).

A escala *Grantham* avalia o efeito da substituição de um aminoácido na conservação da estrutura protéica, tendo como base a composição, a polaridade e o volume molecular de cada aminoácido. Segundo a interpretação dessa escala por Li *et al.* (135), a substituição de um aminoácido pode ser considerada “conservativa” (valores entre 0-50), “moderadamente conservativa” (valores entre 51-100), “moderadamente radical” (valores entre 101-150) e “radical” (valores acima de 151), de acordo com as diferenças físico-químicas.

O algoritmo *PolyPhen* (*Polymorphism Phenotyping*; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) estima o efeito da troca de aminoácidos em uma proteína, levando em conta o nível de conservação da seqüência entre genes homólogos e a proximidade da substituição a domínios funcionais e estruturais da proteína (136). Para isso, a seqüência de aminoácidos “selvagem” e a seqüência de aminoácidos “alterada” são alinhadas a inúmeras seqüências homólogas. Esse alinhamento é utilizado para calcular um escore que aponta a probabilidade de ocorrência de um aminoácido em uma determinada posição e em qualquer posição (*background frequency*). O escore de ambas as seqüências são comparados para prever se a substituição tem efeito “benigno” ou “deletério” e determinar se a substituição observada é ou não notada na família protéica (134). Segundo Xi *et al.* (137), os resultados do escore são classificados em, “provavelmente deletério” ( $\geq 2.00$ ), “possivelmente deletério” (1.50-1.99), “potencialmente deletério” (1.25-1.49), “limítrofe” (1.00-1.24) ou “benigno” (0.00-0.99).

Os testes *in silico* foram empregados para simular o efeito na proteína de uma alteração encontrada no exon 5 do gene *BMP4*.

### **2.3. Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction (PCR-RFLP)**

O genótipo do polimorfismo rs17563 no gene *BMP4* foi determinado pelo uso da técnica de PCR-RFLP. As sequências dos *primers* para a reação de PCR estão representadas na tabela 5. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 15 µl, contendo 1,5µl tampão (10X), 0,6µl MgCl<sub>2</sub> (25µM), 1,5µl dNTP (2µM), 0,35µl *primer sense* (5pmoles), 0,35µl *primer antisense* (5pmoles), 0,5µl DMSO, 0,2µl Taq DNA Polimerase (5U), 1µl DNA (200ng/µl) e 9µl água. As condições dos ciclos da PCR consistiram em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 1 min a 72°C, e uma extensão final a 72°C por 7 min.

A adequada enzima de restrição para o polimorfismo rs17563 (HphI) foi selecionada utilizando o *software Gene Runner*. *Primers*, enzima de restrição e o tamanho dos fragmentos digeridos para o polimorfismo estão listados na tabela 5. A reação de digestão foi realizada em um volume total de 20 µL, contendo 15µl PCR, 0,5µl enzima, 2,0µl Tampão e 2,5µl água. Os produtos de PCR foram digeridos à temperatura de 37°C *overnight* com a enzima HphI (New England BioLabs). Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da PCR, depois estes foram corados em brometo de etídio e visualizados em luz UV. Os produtos de PCR digeridos foram revelados em gel de poliacrilamida 12%.

**Tabela 5.** Primers, enzima de restrição, e tamanho dos fragmentos para o *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) rs17563 no gene *BMP4*.

SNP	Primer	Temperatura de anelamento	Enzima de restrição	Tamanho dos fragmentos
rs17563	Sense 5' CACCATTTCATTGCCCAAC3'	56°C	HphI	Alelo T: 195pb + 229pb
	Anti-sense 5' AGTTTGGCTGCTTCTCCC3'			Alelo C: 424pb

### 2.3.1. Análise Estatística

A frequência dos genótipos e alélica para o polimorfismo rs17563 no gene *BMP4* foi estimada na amostra. Foi utilizado o *software* HaploView para avaliar o equilíbrio de Hardy–Weinberg. A frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs17563 no gene *BMP4* entre casos e controles foi comparada através do teste do Qui-quadrado, odds ratios (OR) e foi utilizado 95% de intervalo de confiança (CI).

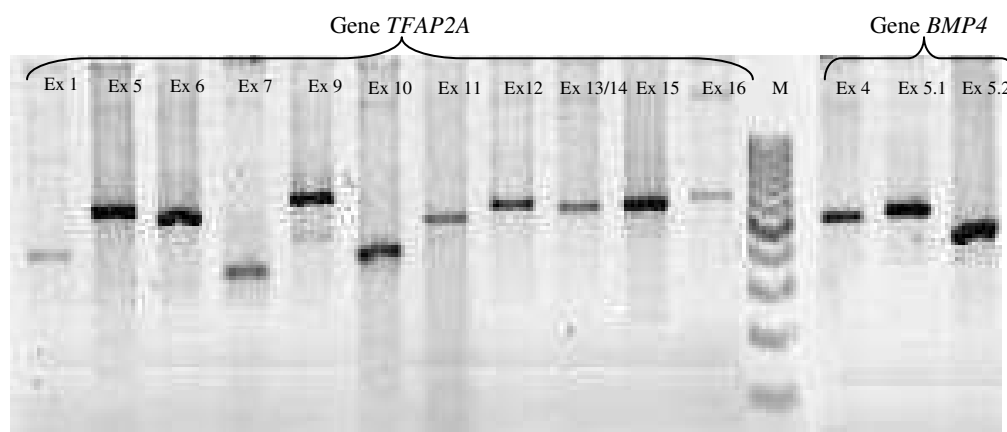
## ***RESULTADOS***

## 1. TRIAGEM DE MUTAÇÕES DOS GENES CANDIDATOS *TFAP2A* E *BMP4*

### 1.1. Amplificação dos fragmentos

- **Gene *BMP4* e *TFAP2A***

A amplificação dos fragmentos de interesse desses genes foi realizada, como demonstrado na figura 7.



**Figura 7.** Demonstrativo de amplificação dos fragmentos dos genes *TFAP2A* e *BMP4*. M: marcador de peso molecular 100pb.

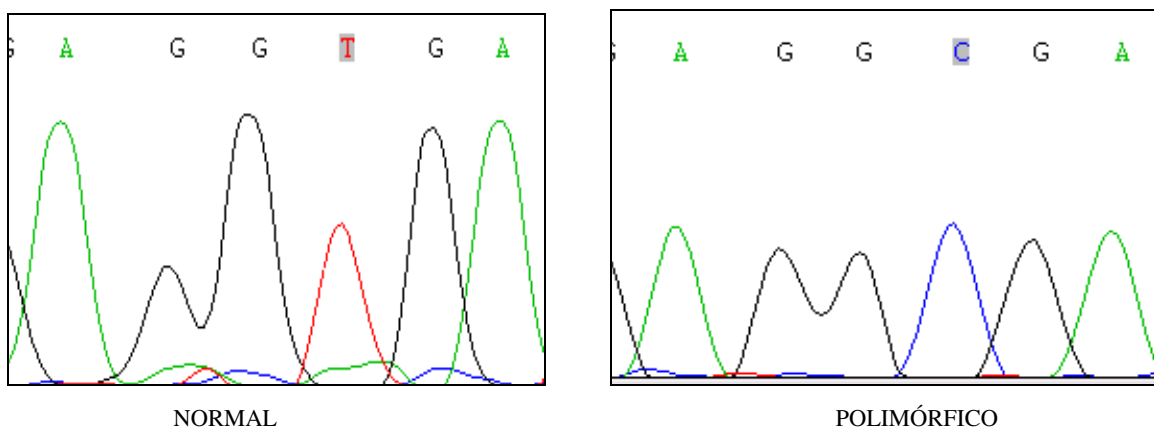
### 1.2. Sequenciamento Automático

- **Gene *BMP4***

Na leitura do sequenciamento do exon 5 do gene *BMP4* detectou-se alterações de seqüência em 14 indivíduos. Os resultados estão representados na figura 8 e tabela 6.



## Exon 5



**Figura 8.** Substituição T → C, exon 5 do gene *BMP4* (rs17563).

Na tabela 6 está representado o resumo do polimorfismo observado no exon 5 do gene *BMP4* e que está descrito na base de dados *Entrez SNP* do NCBI.

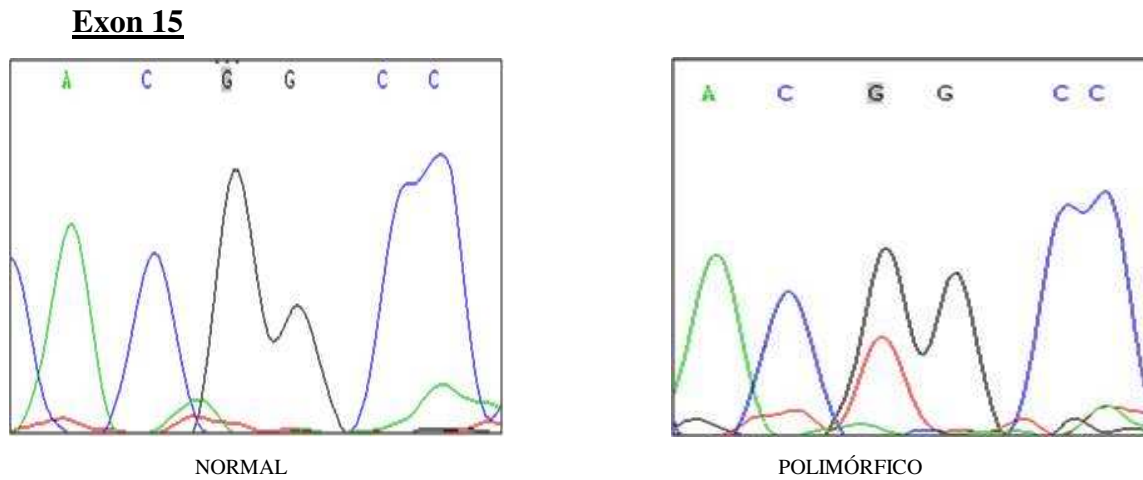
**Tabela 6.** Resumo do polimorfismo observado no gene *BMP4*.

Indivíduos	Posição	SNP	Troca	Seqüência	Aminoácido
1,3,5,8,9,10,1T, 13,18,19, 20,20M,21,22	exon 5	rs17563	T → C	GAACGAGG[T/C]GATCTCC T	Não sinônimo, Val152Ala

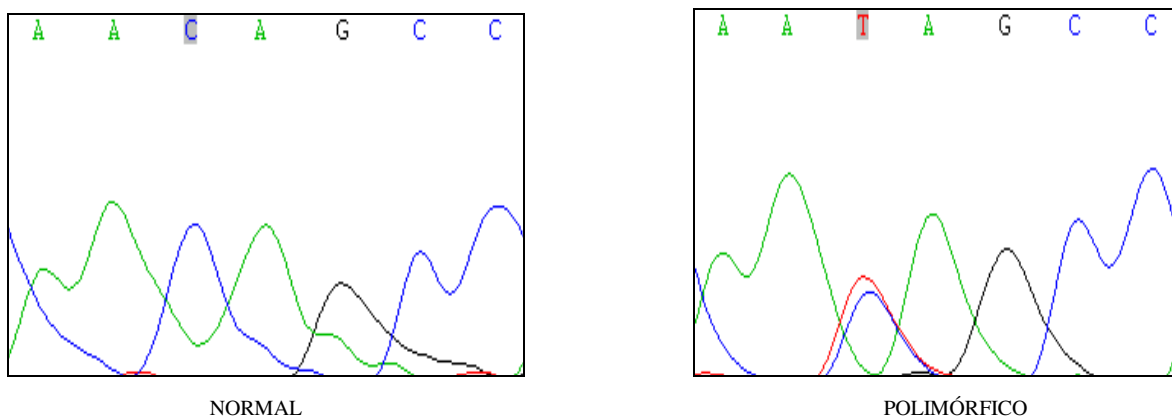
A leitura do sequenciamento do exon 4 do gene *BMP4* não mostrou alterações entre os indivíduos analisados.

▪ **Gene *TFAP2A***

A leitura do sequenciamento do exon 15 do gene *TFAP2A* detectou alterações de seqüência para os indivíduos 5,7,8,14,21. Os resultados estão representados nas figuras 9 e 10 e tabela 7.



**Figura 9.** Substituição **G→T**, exon 15 do gene *TFAP2A* (rs2230116).



**Figura 10.** Substituição **C→T**, exon 15 do gene *TFAP2A* (rs3734391).

Abaixo segue o resumo dos polimorfismos observados no exon 15 do gene *TFAP2A* e que estão descritos na base de dados *Entrez SNP* do NCBI.

**Tabela 7.** Resumo dos polimorfismos observados no gene *TFAP2A*.

Indivíduos	Posição	SNP	Troca	Seqüência	Aminoácido
8,21	exon 15	rs2230116	G→T	GCGGTCAC[G/T]GCCCTGCA	Sinônimo, Thr390Thr
5,7,14	exon 15	rs3734391	C→T	AACCCCAA[C/T]AGCCACAC	Sinônimo, Asn415Asn

A leitura do sequenciamento dos outros exons do gene *TFAP2A* não mostrou alterações entre os indivíduos analisados.

### 1.3. Análise *in silico*

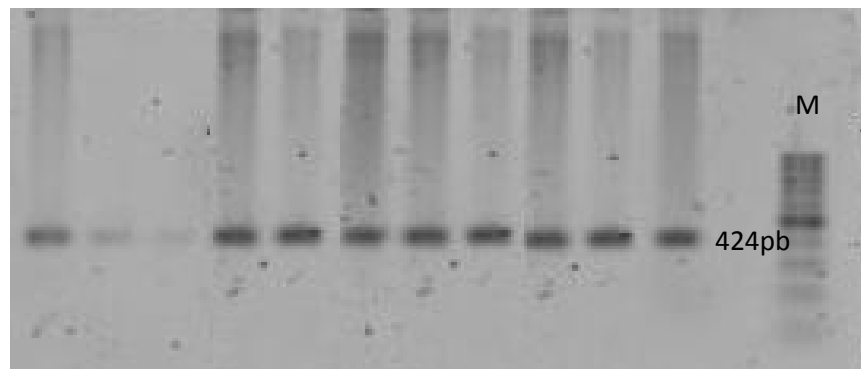
Para avaliar se a substituição  $T \rightarrow C$  no exon 5 do gene *BMP4*, altera a função e a estrutura da proteína codificada por esse gene, foram aplicados dois testes *in silico*: escala *Grantham* e algoritmo *PolyPhen*. A seqüência de aminoácidos utilizada nos testes foi obtida na base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os resultados dos testes *in silico* foram semelhantes. Pela escala *Grantham*, essa alteração foi considerada “moderadamente conservativa” (valor 64), sugerindo que as propriedades físico-químicas desses aminoácidos são semelhantes e, deste modo, tal troca não prejudicaria de forma significativa a estrutura e a função da proteína. O algoritmo *PolyPhen* alinhou as seqüências

“selvagem” e “alterada” a 75 seqüências homólogas e estimou que essa alteração é “benigna” (escore 0.416).

## 2. RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORFISM-POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR-RFLP) DO GENE *BMP4*

### 2.1. Amplificação do fragmento

A amplificação do fragmento de interesse desse gene foi realizada, como demonstrada na figura 11.

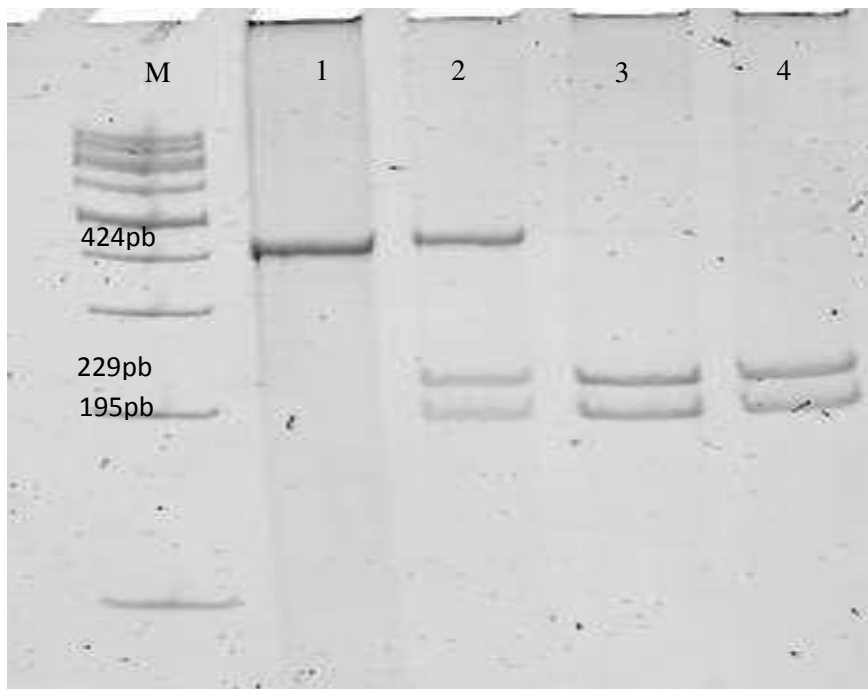


**Figura 11.** Demonstrativo de amplificação do fragmento do exon 5 do gene *BMP4*. M: marcador de peso molecular 100pb.

### 2.2. Digestão com enzima

O resultado está representado na figura 12. As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs17563 no gene *BMP4* entre controles e casos apresentam-se na tabela 8.

Os genótipos do polimorfismo estão em equilíbrio de Hardy–Weinberg ( $p=0,999$ ) tanto para o grupo com FL±P (0.6296) quanto para o grupo controle ( $p= 0,7203$ ).



**Figura 12.** Ensaio de PCR-RFLP para análise do polimorfismo rs17563 no gene *BMP4*. Produtos de PCR foram digeridos com a enzima HphI e separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Linha 1: genótipo homocigoto CC mostrando apenas um fragmento de 424pb; linha 2: genótipo heterocigoto TC mostrando três fragmentos de 424pb, 229pb e 195pb; linhas 3,4: genótipo homocigoto TT mostrando dois fragmentos de 229pb e 195pb; linha M: marcador de peso molecular 100pb.

**Tabela 8.** Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo rs17563 no gene *BMP4* em pacientes e controles.

Polimorfismo	Pacientes FL±P n=45(%)		Controles n=169 (%)
	Sindrômico n =20	Não-Sindrômico n=25	
Genótipos			
TT	6(30)	7(28)	43(25.44)
TC	8(40)	12(48)	88(52.07)
CC	6(30)	6(24)	38(22.49)
Alelos			
T	44(50)	62(50)	174 (51.48)
C	44(50)	62(50)	164 (48.52)

Através da análise estatística, constatou-se que não houve diferença significativa na frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo rs17563 entre os casos com FL±P e o grupo controle ( $p=0,3347$ ,  $OR=0,718255$ ,  $95\%CI$ ,  $0,4-1,27$ ).

## ***DISCUSSÃO***

Tendo em vista a complexidade etiológica das FOT, as diferenças populacionais, as regiões cromossômicas já associadas a este defeito congênito e os estudos em modelos animais, a investigação dos genes *BMP4* e *TFAP2A* estariam justificadas. O primeiro, principalmente, por existirem relatos de associação em população com etnia diferente (117,118) e o segundo, pelo fenótipo resultante de mutações em modelos animais (95).

Nesta amostra, foram investigados indivíduos síndrômicos e não síndrômicos, diferentemente do estudo acima referido. De modo geral, a análise dos sequenciamentos dos genes candidatos revelou algumas alterações, mostrando-se necessária confirmação com relação à patogenicidade, o que foi realizada com a consulta a bancos de dados contendo polimorfismos já descritos na literatura ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)).

Com relação ao gene *BMP4*, 34 indivíduos, 14 casos síndrômicos e 20 não síndrômicos, apresentavam o polimorfismo rs17563. A presente amostra, avaliada por médico geneticista, foi rigorosa na separação entre casos síndrômicos e não síndrômicos, o que não costuma ocorrer em estudos populacionais. Considerando que este mesmo polimorfismo foi detectado nos dois grupos estudados, é possível que a ocorrência do polimorfismo rs17563 e sua associação com FL±P na população brasileira sejam eventuais.

O polimorfismo rs17563 no gene *BMP4* leva à troca T → C no exon 5 e à mudança do aminoácido valina por alanina na posição 152 da proteína. Os resultados dos testes *in silico* foram semelhantes. Pela escala Grantham, essa alteração foi considerada “moderadamente conservativa”, sugerindo que as propriedades físico-químicas desses aminoácidos são semelhantes e, assim, tal troca não prejudicaria de forma significativa a



estrutura e a função da proteína. O algoritmo *PolyPhen* estimou que essa alteração é “benigna”. Todavia, os resultados desse tipo de análise não podem ser considerados conclusivos já que apenas a investigação experimental do efeito dessa mutação na proteína BMP4 poderá elucidar as suposições apresentadas.

Além disso, a homozigose do alelo C codifica o aminoácido alanina, enquanto que o códon com alelo T codifica valina na posição 152 da molécula de proteína. Este fato suporta a hipótese de que a presença de um alelo C em homozigose poderia acarretar na codificação de uma quantidade insuficiente da proteína BMP4. Com isso, haveria uma alteração qualitativa ou quantitativa no local de produção de BMP4 ou na sua eficácia através de seu receptor cognato. Estudos da sequência do peptídeo BMP4 no camundongo, rato e galinha revelam que a valina nesta posição é altamente conservada, e isto daria maior suporte para a afirmação de que a transição para uma citosina seria deletéria (117).

Lin *et al.* (117) realizaram um estudo de caso/controle para avaliar se o polimorfismo rs17563 no gene *BMP4*, que resulta em uma mudança do aminoácido valina(Val) por alanina(Ala) (V152A), estava associado a FL±P não síndrômica em uma população de crianças chinesas. Os genótipos de 184 pacientes com FL±P não-sindrômica e 205 controles foram testados utilizando *Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction* (PCR-RFLP). Os resultados mostraram diferenças significativas na distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo rs17563 no gene *BMP4* entre os casos e controles. Assim, os resultados desse estudo suportam a hipótese de que esse polimorfismo pode ser clinicamente importante no desenvolvimento e progressão de FL±P. No entanto, esta associação deve ainda ser confirmada por outros estudos em

populações de etnias semelhantes e distintas à população chinesa. Além disso, os potenciais efeitos dos polimorfismos observados sobre o desenvolvimento de FL±P não sindrômica necessitam de caracterização em estudos funcionais.

Nesse mesmo estudo Lin *et al.* (117), observaram que a frequência do alelo 538C entre os controles saudáveis foi de 0,317. Esta foi superior à detectada em controles coreanos (0,27) (138). Contudo, outros estudos em populações saudáveis, revelaram que este polimorfismo aparecia em menor frequência na população chinesa, quando comparado às populações alemãs (139), italiana (140) e caucasiana (141) (0,56, 0,50 e 0,40, respectivamente). Estes resultados ainda identificam heterogeneidade entre diferentes populações.

Suzuki *et al.* (118) publicaram um estudo com 1614 indivíduos provenientes de diferentes países (Mongólia, Filipinas, Estados Unidos da America, Colômbia, Guatemala e Europa). Neste, 968 indivíduos apresentavam FLP, 30 microformas e 87 com defeito no músculo orbicular oral. Informação referente às formas sindrômicas ou não sindrômicas não é fornecida. Há menção de que foram encontrados indivíduos com microformas, entre os quais foram detectadas mutações de sentido trocado e sem sentido no gene *BMP4*. Entretanto, o artigo não deixa claro em qual o tipo de FOT o polimorfismo rs17563 foi detectado. Além disso, foi observada uma diferença limítrofe nas frequências deste polimorfismo nos afetados e controles, a qual também não é referida em detalhes.

Assim, considerando os achados na presente amostra foi analisado um grupo de 169 indivíduos controle, previamente selecionados com base em heredograma de três

gerações, para verificação dos alelos para o polimorfismo rs17563 no gene *BMP4* na população brasileira.

No presente estudo, o polimorfismo rs17563 no gene *BMP4* não foi associado à patogênese de FL±P ( $p=0,3347$ ,  $OR=0,718255$ ,  $95\%CI$ ,  $0,4-1,27$ ). Contudo, a confirmação desta tendência necessita de ampliação do tamanho amostral, tanto nos de indivíduos com FL±P, quanto no grupo controle.

As alterações observadas na região transcrita do exon 15 (rs2230116 e rs3734391) são sinônimas, ou seja, não há troca de aminoácido e estão validadas como SNP em base de dados *Entrez SNP* do *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Essas alterações não apresentam relação com qualquer quadro de malformação ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)) e, até o momento, não foram investigadas em humanos, além da amostra deste estudo. Também, neste caso, o tamanho amostral não permite conclusões sobre o envolvimento deste gene na etiologia de FL±P.

## ***CONCLUSÕES***

Considerando os resultados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que:

1. Este trabalho foi o primeiro a contribuir para o esclarecimento do papel dos genes *BMP4* e *TFAP2A* na etiologia das FLP na população brasileira.
2. Foi identificado o polimorfismo rs17563 no gene *BMP4* na presente amostra. Entretanto, seu significado depende de aumento do tamanho amostral.
3. No gene *TFAP2A* foram encontrados polimorfismos não associados à FL±P até o momento.

## ***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. Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S. Nonsyndromic cleft lip and palate: complex genetics and environmental effects. *Ann Hum Genet.* 2001; 65: 505-15.
4. Ferguson MW. Palate development. *Development.* 1988; 103: 41-60.
5. Fraser FC. The genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Hum Genet.* 1970; 22 (3): 336-52.
6. Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet.* 1999; 8: 1853-59.
7. Bender PL. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs.* 2000; 15: 242-9.
8. Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet.* 2002; 61: 248-56.
9. Marazita ML, Mooney MP. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and cleft palate. *Clin Plastic Surg.* 2004; 31:125-40.
10. Bonaiti C, Briard ML, Feingold J, Pavy B, Psaume J, Migne-Tufferaud G *et al.* An epidemiological and genetic study of facial clefting in France I. Epidemiology and frequency in relatives. *J Med Genet* 1982; 19 (1): 8-15.
11. Forrester MB, Merz RD. Descriptive epidemiology of oral clefts in a multiethnic population, Hawaii, 1986–2000. *Cleft Palate Craniofac J.* 2004; 41: 622-8.

12. ECLAMC (Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas) Documento Final. Angra dos Reis: XXXVI ECLAMC; 2004. (Versão eletrônica: Fevereiro 2005, Rio de Janeiro).
13. Oliver-Padilha G, Martinez-Gonzales V. Cleft lip and palate in Puerto Rico: a 33 year study. *Cleft Palate J.* 1986; 23: 48-57.
14. Vanderas AP. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft Palate J.* 1987; 24: 216-25.
15. Schliekelman P, Slatkin M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. *Am J Hum Genet.* 2002; 71: 1369-85.
16. Cobourne MT. The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod.* 2004; 26: 7-16.
17. 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.
18. Eppley BL, Van Aalst JA, Robey A, Havlik RJ, Sadove AM. The spectrum of orofacial clefting. *Plast Reconstr Surg.* 2005; 7: 110e-4e.
19. Mitchell LE, Risch N. Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis. *Am J Hum Gene.* 1992; 51: 323-32.
20. Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri NE. Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. *Cleft Palate-Craniofac J.* 1996; 33: 406-17.
21. Fraser FC. Liability, thresholds, malformations, and syndromes. *Am J Med Genet.* 1996; 66: 75-6.



22. Murray JC, Schutte BC. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1676-8.
23. Cohen MM Jr. Malformations of the Craniofacial Region: Evolutionary, Embryonic, Genetic and Clinical Perspectives. *Am J Med Genet.* 2002; 115: 245-68.
24. Trasler DG. Pathogenesis of cleft lip and its relation to embryonic face shape in A-J and C57BL mice. *Teratology.* 1968; 1: 33-49.
25. Diewert VM, Wang KY. Recent advances in primary palate and midface morphogenesis research. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992; 4: 111-30.
26. Moore KL, Persaud TVN. *The developing human: clinically oriented anatomy.* Philadelphia: W.B. Saunders, 1998.
27. Garcia-Castro M, Bronner-Fraser M. Induction and differentiation of the neural crest. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11:695-8.
28. Coburn MT. Construction for the modern head, current concepts in craniofacial development. *J Orthod.* 2000; 27:307-14.
29. Sperber GH. Craniofacial embryogenesis: normal developmental mechanisms. In: Mooney MP, Siegel MI, editors. *Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting.* New York: John Wiley and Sons, 2002. p.31-60.
30. Sperber GH. *Craniofacial development.* Hamilton, Ontario: B.C. Decker; 2001.
31. Johnston MC, Bronsky PT. Craniofacial embryogenesis: abnormal developmental mechanisms. In: Mooney MP, Siegel MI, editors. *Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting.* New York: John Wiley and Sons, 2002. p.61-124.

32. Marazita ML. Genetic etiologies of facial clefting. In: Mooney MP, Siegel MI, editors. Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting. New York: John Wiley and Sons, 2002. p. 147-62.
33. Verwoerd DCA, Van Oostrom CG. Cephalic neural crest and placodes. *Adv Anat Embryol Exp Morphol.* 1978; 58:1-75
34. Sulik KK, Schoenwolf GC. Highlights of craniofacial morphogenesis in mammalian embryos as revealed by scanning electron microscopy. *Scanning Electron Microsc.* 1985; 4:1735-52
35. 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.
36. Wilkie AO, Morriss-Kay G.M. Genetics of craniofacial development and malformation. *Genetics.* 2001; 2: 458-68.
37. Rice DPC. Craniofacial Anomalies: From Development to Molecular Pathogenesis. *Current Molecular Medicine.* 2005; 5: 699-722.
38. Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Doi H, Eto K. The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Dev Biol.* 1994; 164: 409-19.
39. Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn.* 2006; 235: 1152-66.
40. Sulik KK, Johnston MC. Embryonic origin of holoprosencephaly: interrelationship of the developing brain and face. *Scan Electron Microsc.* 1982; 1:309-22.
41. Mooney MP, Siegel MI, editors. Understanding craniofacial anomalies: the etiopathogenesis of craniosynostosis and facial clefting. New York: John Wiley and Sons, 2002. p. 251-72.

42. Carstens MH. Development of the facial midline. *J Craniofac Surg* 2002; 13: 129-87.
43. Juriloff DM. Mapping studies in animal models. In: Wyszynski DF, editor. *Cleft lip and palate. From origin to treatment*. New York: Oxford University Press, 2002. p265-82.
44. Burdi AR, Faist K. Morphogenesis of the palate in normal human embryos with special emphasis on the mechanisms involved. *Am J Anat*. 1967; 120:149.
45. Kaartainen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGFbeta3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet*. 1995; 11: 415-21.
46. Kaartinen V, Cui XM, Heisterkamp N, Groffen J, Shuler CF. Transforming growth factor-beta3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev Dyn*. 1997; 209:225-60.
47. Diewert VM, Shiota K. Morphological observations in normal primary palate and cleft lip embryos in the Kyoto collection. *Teratology*. 1990; 41: 663-77.
48. Wang KY, Juriloff DM, Diewert VM. Deficient and delayed primary palatal fusion and mesenchymal bridge formation in cleft lip-labile strains of mice. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1995; 15: 99-116.
49. Gorlin RJ, Cohen MMJr, Hennekam RCM. *Syndromes of the head and neck*, 4<sup>th</sup> edition. New York:Oxford University Press. 2001.
50. Murray JC. Face facts: genes, environment, and clefts. *Am J Hum Genet*. 1995; 57(2): 227-32.
51. 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.
52. Cohen MM Jr. Etiology and pathogenesis of orofacial clefting. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2000; 12: 379-97.
  53. Källén K. Maternal smoking and orofacial clefts. *Cleft Palate-Craniofac J.* 1997; 34: 11-6.
  54. Carinci F, Pezzetti F, Scapoli L, Martinelli M, Avantiaggiato A, Carinic P. Recent developments in orofacial cleft genetics. *J Craniofac Surg.* 2003; 14, 130-43.
  55. 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. *Birth Defects Res* 2009; 85:42-51.
  56. 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.
  57. Chevrier C, Perret C, Bahuau 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.
  58. Shemer G, Podbilewicz B. Fusomorphogenesis: cell fusion in organ formation. *Dev Dyn.* 2000; 218:30-51.
  59. Juriloff DM, Harris MJ. Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate *Birth Defects Research.* 2008; 82: 63-77.
  60. Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, Russo ET, *et al.* Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 4512-17.

61. 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.
62. Richardson RJ, Dixon J, Malhotra S, Hardman MJ, Knowles L, Boot-Handford RP *et al.* *Irf6* is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *Nat Genet.* 2006; 3: 1329-34.
63. Satokata I, Maas R. *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994; 6: 348-56.
64. Brewer C, Holloway S, Zawalynski P, Schinzel A, FitzPatrick D. A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet.* 1998; 63:1153-9.
65. Brewer C, Holloway S, Zawalynski 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.
66. Brewer CM, Leek JP, Green AJ, Holloway S, Bonthron DT, Markham AF, FitzPatrick DR. A locus for isolated cleft palate, located on human chromosome 2q32. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 387-96.
67. Ardinger HH, Buetow KH, Bell GL, Bardach J, Van Demark 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.
68. Shaw D, Ray A, Marazita M. Further evidence of a relationship between the retinoic acid receptor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (CL/P). *Am J Hum Genet.* 1993; 53: 1156-57.
69. Mitchell LE, Heale SC, Chenevix-Trench G. Evidence for an association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and a gene located on the long arm of chromosome 4. *Am J Hum Genet.* 1995; 57: 1130-6.

70. Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PE *et al.* Role of the Dix homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dix-1, Dix-2, and Dix-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol.* 1997; 185: 165-84.
71. Stein J, Mulliken JB, Stal S, Gasser DL, Malcom S, Winter R *et al.* Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to *BCL3* in 17 multigeneration families. *Am J Hum Genet.* 1995; 57: 257-72.
72. Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Martinelli M, Carinci P, Tognon M. Evidence of linkage to 6p23 and genetic heterogeneity in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Genomics.* 1997; 43: 216-20.
73. Diehl SR, Erickson RP. Genome scan for teratogen-induced clefting susceptibility loci in the mouse: evidence of both allelic and locus heterogeneity distinguishing cleft lip and cleft palate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 5231-6.
74. Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S *et al.* Association of *MSX1* and *TGFB3* with nonsyndromic clefting in humans. *Am. J Hum Genet.* 1998; 63(2): 557-68.
75. Sertié AL, Sousa AV, Steman S, Pavanello RC, Passos-Bueno MR. Linkage analysis in a large Brazilian family with van der Woude syndrome suggests the existence of a susceptibility locus for cleft palate at 17p11.2-11.1. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 433-40.
76. Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15: 270-8.
77. Vieira AR, Vieira AR, Ávila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix TM *et al.* Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate, *PLoS Genet.* 2005; 1(6): e64.

78. Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa ARS, Ladrail AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) and fibroblast growth factor receptor (*FGFR1*) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet* 2007; 143:538-45.
79. Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008; 87(2):119-25.
80. 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.
81. Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in *IRF6* contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A.* 2005; 137(3): 259-62.
82. Van den Boogaard MH, Dorland M, Beemer FA, Van Amstel HKP. *MSX1* mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet.* 2000; 24: 342-3.
83. 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.
84. Modesto A, Moreno LM, Krahn K, King S, Ladrail AC. *MSX1* and orofacial clefting with and without tooth agenesis. *J. Dent Res.* 2006; 85: 542-6.
85. 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.
86. Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G *et al.* C677T variant in the *MTHFR* gene and CLP. A risk factor for mothers? *Am J Med Genet.* 2001; 98: 357-60.

87. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW *et al.* Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science*. 1988; 242:1528-34.
88. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*. 1996; 10: 1580-94.
89. Ebara S, Nakayama K. Mechanism for the action of bone morphogenetic proteins and regulation of their activity. *Spine*. 2002; 27: S10–5.
90. Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev*. 1995; 9: 2105-16.
91. Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, McMahon AP *et al.* Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature*. 1996; 381: 238-41.
92. Jones CM, Lyons KM, Hogan BL. Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (*BMP-4*) and *Vgr-1* in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development*. 1991; 111: 531-42.
93. Jiao K, Kulesa H, Tompkins K, Zhou Y, Batts L, Baldwin HS, Hogan BL. An essential role of *Bmp4* in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes Dev*. 2003; 17: 2362-7.
94. Liu W, Selever J, Wang D, Lu M.F, Moses KA, Schwartz RJ *et al.* *Bmp4* signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 4489-94.
95. Liu W, Sun XX, Braut A, Mishina Y, Behringer RR, Mina M *et al.* Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice. *Development*. 2005; 132: 1453-61.



96. Selever J, Liu W, Lu MF, Behringer RR, Martin JF. *Bmp4* in limb bud mesoderm regulates digit pattern by controlling AER development. *Dev Biol.* 2004; 276: 268-79.
97. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of *BMP2*, *BMP4*, and *BMP7* in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2006; 2: 216.
98. Dunn NR, Winnier GE, Hargett LK, Schrick JJ, Fogo AB, Hogan BL. Haploinsufficient phenotypes in *Bmp4* heterozygous null mice and modification by mutations in *Gli3* and *Alx4*. *Dev Biol.* 1997; 188: 235-47.
99. Katagiri T, Boorla S, Frendo JL, Hogan BL, Karsenty G. Skeletal abnormalities in doubly heterozygous *Bmp4* and *Bmp7* mice. *Dev Genet.* 1998; 22: 340-8.
100. Hu J, Chen YX, Wang D, Qi X, Li TG, Hao J *et al.* Developmental expression and function of *Bmp4* in spermatogenesis and in maintaining epididymal integrity. *Dev Biol.* 2004; 276: 158-71.
101. Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Hogan BL, Ichikawa I. Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *J Clin Invest.* 2000; 105: 863-73.
102. Eblaghie MC, Reedy M, Oliver T, Mishina Y, Hogan BL. Evidence that autocrine signaling through *Bmpr1a* regulates the proliferation, survival and morphogenetic behavior of distal lung epithelial cells. *Dev Biol.* 2006; 291: 67-82.
103. Chang W, Lin Z, Kulesa H, Hebert J, Hogan BL, Wu DK. *Bmp4* is essential for the formation of the vestibular apparatus that detects angular head movements. *PLoS Genet.* 2008; 4: 1000050.
104. Shigetani Y, Nobusada Y, Kuratani S. Ectodermally derived *FGF8* defines the maxilla mandibular region in the early chick embryo: epithelial–mesenchymal

- interactions in the specification of the craniofacial ectomesenchyme. *Dev Biol.* 2000; 22: 73-85.
105. Cai J, Ash D, Kotch LE. Gene expression in pharyngeal arch 1 during human embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2005; 14: 903-12.
  106. Gong SG, Guo C. *Bmp4* gene is expressed at the putative site of fusion in the midfacial region. *Differentiation.* 2003; 71: 228-36.
  107. Cox TC. Taking it to the max: the genetic and developmental mechanisms coordinating midfacial morphogenesis and dysmorphology. *Clin Genet.* 2004; 65: 163-76.
  108. Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev.* 1995; 9: 2795-807.
  109. Furuta Y, Hogan, BL. *BMP4* is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev.* 1998; 12: 3764-75.
  110. Wawersik S, Purcell P, Rauchman M, Dudley AT, Robertson EJ, Maas R. BMP7 acts in murine lens placode development. *Dev Biol.* 1999; 207:176-88.
  111. Chang B, Smith RS, Peters M, Savinova OV, Hawes NL, Zabaleta A *et al.* Haploinsufficient *Bmp4* ocular phenotypes include anterior segment dysgenesis with elevated intraocular pressure. *BMC Genet.* 2001; 2: 18.
  112. Shuman JB, Gong SG. RNA interference of *Bmp-4* and midface development in postimplantation mouse embryos. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007; 131: 447e1-11.
  113. Behnan SM, Guo C, Gong TW, Shum L, Gong SG. Gene and protein expression of transforming growth factor beta 2 gene during murine primary palatogenesis. *Differentiation.* 2005; 73: 233-9.

114. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP *et al.* TGF beta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non overlapping with other TGF beta knockout phenotypes. *Development*. 1997; 124: 2659-70.
115. 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.
116. Bodo M, Baroni T, Carinci F, Becchetti E, Bellucci C, Pezzetti F *et al.* TGF beta isoforms and decorin gene expression are modified in fibroblasts obtained from nonsyndromic cleft lip and palate subjects. *J Dent Res*. 1999; 78: 1783-90.
117. Lin JY, Chen YJ, Huang YI, 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 Biol*. 2008; 27: 601-5.
118. Suzuki S, Marazita ML, Cooper ME, Miwa N, Hing A, Jugessur A *et al.* Mutations in *BMP4* are Associated with Subepithelial, Microform, and Overt Cleft Lip. *Am J Hum Genet*. 2009; 84(3): 406-11
119. Meier P, Koedood M, Philipp J, Fontana A, Mitchell PJ. Alternative mRNAs encode multiple isoforms of transcription factor AP-2 during murine embryogenesis. *Dev Biol*. 1995; 169: 1-14.
120. Donner AL, Williams T. Frontal nasal prominence expression driven by *Tcfap2a* relies on a conserved binding site for STAT proteins. *Dev Dyn*. 2006; 235:1358-70.
121. Mitchell LE, Risch N. Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis. *Am J Hum Gene*. 1992; 51: 323-32.
122. Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ. Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature*. 1996; 381: 235-8.

123. West-Mays JA, Zhang J, Nottoli T, Hagopian-Donaldson S, Libby D, Strissel KJ *et al.* AP-2a transcription factor is required for early morphogenesis of the lens vesicle. *Dev Biol.* 1999; 206: 46-62.
124. Ahituv N, Erven A, Fuchs H, Guy K, Ashery-Padan R, Williams T *et al.* An ENU-induced mutation in AP-2a leads to middle ear and ocular defects in Doarad mice. *Mamm Genome.* 2004; 15: 424-32.
125. Nelson DK, Williams T. Frontonasal process-specific disruption of AP-2a results in postnatal midfacial hypoplasia, vascular anomalies, and nasal cavity defects. *Dev Biol.* 2004; 267: 72-92.
126. 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.
127. Moreno LM, Arcos-Burgos M, Marazita ML, Krahn K, Maher BS, Cooper ME. Genetic analysis of candidate loci in non-syndromic cleft lip families from Antioquia-Colombia and Ohio. *Am J Med Genet.* 2004; 125A: 135-44.
128. Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcolm S. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet.* 2000; 106: 345-50.
129. Schultz RE, Cooper ME, Daack-Hirsch S, Shi M, Nepomucena B, Graf KA *et al.* Targeted scan of fifteen regions for nonsyndromic cleft lip and palate in Filipino families. *Am J Med Genet A.* 2004; 125: 17-22.
130. 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.

131. 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.
132. Araújo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra JRG, Farah SB, Mello MP. Molecular analysis of *CYP21* and *C4* genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29: 1-13.
133. MC Pherson MJ, Moller SG. PCR: The basics from background to bench. BIOS Scientific Publishers Limited. 2000; 27-29.
134. Chan PA, Duraisamy S, Miller PJ, Newell JA, McBride C, Bond JP *et al.* Interpreting Missense Variants: Comparing Computational Methods in Human Disease Genes *CDKN2A*, *MLH1*, *MSH2*, *MECP2*, and Tyrosinase (*TYR*). *Human Mutation.* 2007; 28(7): 683-93.
135. Li WH, Wu CI, Luo CC. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *J Mol Evol.* 1984; 21: 58-71.
136. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human no-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Research.* 2002; 30: 17.
137. Xi T, Jones IM, Mohrenweiser HW. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. *Genomics.* 2004; 83: 970-99.
138. Choi JY, Shin CS, Hong YC, Kang D. Single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of bone morphogenetic protein genes and peripheral bone mineral density in young Korean men and women. *Calcif Tissue Int.* 2006; 78: 203-11.

139. Felder B, Steqmann K, Schultealbert A, Geller F, Strehl E, Ermert A *et al.* Evaluation of *BMP4* and its specific inhibitor NOG as candidates in human neural tube defects (NTDs). *Eur J Human Genet.* 2002; 10: 753-6.
140. Semprini S, Mango R, Brancati F, Dallapiccola B, Becherini L, Novelli G *et al.* Absence of correlation between *BMP-4* polymorphism and post menopausal osteoporosis in Italian women. *Calcif Tissue Int.* 2000; 67: 93-4.
141. Mangino M, Torrente I, deLuca A, Sanchez O, Dallapiccola B, Novelli G. A single-nucleotide polymorphism in the human bone morphogenetic protein-4 (*BMP4*) gene. *J Hum Genet.* 1999; 44: 76-7.

# ***ANEXOS***

## 1. ANEXO I. 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:** Nº 714/2008 (Este nº 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





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. Carmen Sílvia Bertuzzo*  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM/UNICAMP

## 2. ANEXO II. 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 Performance 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 consequências dos resultados serão devidamente

explicadas a mim em consultada agendada no Ambulatório Dismorfologia Craniofacial do HC/UNICAMP ou pelo médico responsável. Dependendo da informação, sei que poderei solicitar consultas adicionais para maiores esclarecimentos ou realizar aconselhamento genético direcionado sem nenhum custo.

Em caso de dúvida ou para informação adicional, poderei contatar os pesquisadores do Departamento de Genética Médica, no telefone (19) 3521.8907, na pessoa da Dra. Vera L. Gil da Silva Lopes ou na pessoa de Milena Simioni. A fim de facilitar a comunicação, comprometo-me a manter atualizado meu endereço e telefone de contato.

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

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

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

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

como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

---

Nome e RG do sujeito da pesquisa

---

Nome e RG do responsável legal

---

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

Data

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

---

Nome e RG do sujeito da pesquisa

---

Nome e RG do responsável legal

---

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

Data

## **RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR**

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

---

Nome e RG do pesquisador

---

Assinatura do pesquisador

---

Data

## **PARTICIPAÇÃO DE INDIVÍDUOS CONTROLES**

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

Entendi que todas as informações constadas neste termo quanto a procedimentos, sigilo, resultados e contatos para resultados (se eu desejar saber), serão iguais aos demais indivíduos não-controle deste estudo. Fui informado também que poderei autorizar que o meu material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular/FCM/Unicamp. Caso este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da (s) amostra (s).

---

Nome e RG do indivíduo controle

---

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

Data

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

<p><b>Distúrbio congênito:</b> 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.</p>
<p><b>Defeito <i>major</i> (grave):</b> qualquer defeito morfológico e/ou funcional com impacto relevante sobre a saúde, podendo levar à morte ou incapacidade permanente.</p>
<p><b>Defeito isolado:</b> qualquer caso com apenas um defeito grave ou Sequência. Exemplo: fenda labial bilateral + deformidades nasais.</p>
<p><b>Seqüência:</b> 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 seqüência é um defeito isolado. Exemplo: Sequência de Pierre Robin, dois ou mais defeitos cardíacos.</p>
<p><b>Defeitos não relacionados:</b> 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.</p>
<p><b>Síndrome:</b> 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).</p>
<p><b>Síndrome conhecida:</b> 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</p>

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.



#### 4. ANEXO IV. Dados Clínicos dos Indivíduos

Indivíduo	Sexo	Tipo de fenda	Grupo	Aspectos faciais e cranianos	Outros achados	Cariótipo
1	M	FLP	1	Nd	nd	46, XY
3	M	FL	1	Nd	nd	46,XY
4	F	FLP	2	Occipital plano, implatação dos cabelos na frente baixa, hipoplasia malar, orelhas de implatação baixa e dismórficas, sinofre, fendas palpebrais oblíquas para cima, narinas assimétricas, filtro labial longo e fino	Pescoço alado, peito escavado, fóvea coccígea, espinha bífida , clínodactilia de membros superiores e inferiores, braquidactilia	46,XX
5	M	FL	2	Hisurtismo em frente, implatação dos cabelos na nuca baixa, orelhas de implatação baixa e dismórficas, malformação auricular, sobrelhas arqueadas, fendas palpebrais obliquas para cima	Escoliose, braquidactilia de membros superiores, criptorquidia, cardiopatia congênita	46,XY
7	M	FL	1	Nd	nd	46,XY
8	M	FLP	1	Pregas epicânticas	Mamilos hipoplásicos, aumento da distância intermamilar, prega palmar única completa direita e	46,XY

					esquerda	
9	M	FLP	1	Nd	Nd	46,XY
10	F	FL	2	Braquicefalia, occipital plano, frontal abaulado, glabella proeminente, implantação baixa das orelhas, hipertelorismo, pregas epicânticas, base nasal alargada, retrognatismo	Aumento da distância intermamilar, clinodactilia, calcâneo proeminente	46,XX
12	M	FL	1	Nd	Nd	46,XY
13	M	FLP	2	pregas epicânticas, fendas palpebrais oblíquas para baixo	MS: clinodactilia, hiperextensibilidade articular, esplenomegalia, cardiopatia, RDNPM	46,XY
14	F	FLP	2	occipital proeminente, frontal alto, implantação dos cabelos na fronte alta, face alongada, hipoplasia malar, hipertelorismo, blefarotalmia, hipoplasia maxilar, alteração da pigmentação	Nd	46,XX
15	F	FLP	2	orelhas baixas e dismórficas, face alongada, queda palpebral, microcefalia, prognatismo,	cardiopatia congênita, RDNPM, atraso/distúrbio de linguagem, dificuldade de aprendizagem, distúrbio de comportamento, baixa estatura, hipoacusia neurossensorial profunda,	46,XX

					escoliose, alterações costo-vertebrais	
16	M	FLP	2	Catarata congênita, microtia, "pits" pré-auriculares em lóbulo direito, fendas palpebrais obliquas para baixo, ptose palpebral, philtrum longo e apagado, palato alto, clinodactilia, prega palmar única direita, occipital plano, hipertonia		46, XY
18	F	FL	2			46,XX,t(4,5)(p10;p10)pat, 9qh+Pat,16qh+mat[50]
19	F	FL	2	Macrocefalia, Pit pre auriculares	Polegares e halux alongados	46,XX
20	M	FLP	1			46, XY
21	F	FLP	1	hipertelorismo ocular, fendas palpebrais obliquas para cima, narina esquerda fendada,		46,XX
22	F	FLP	2	pregas epicânticas, fronte plana, hipoplasia malar, fendas palpebrais para cima	RDNPM, convulsões,	46,XX/47,XX,+mar
23	F	FLP	2			46,XX
24	F	FL unilateral direita	1			46,XX

25	M	FL	2			46, XY
26	F	FLP	2			46,XX
27	M	FLP	2			46, XY
28	F	FLP	2			46,XX
30	F	FLP	2			46,XX
31	F	FLP	1			46,XX
32	F	FL	1			46,XX
33	M	FL unilateral esquerda	1			46, XY
34	F	FLP	2			46,XX
35	F	FLP unilateral esquerda	2			46,XX
36	F	FLP	1			46, XX
37	M	FLP	1	fenda labial e alveolar incompleta do lado esquerdo e palato mole completo		46, XY
38	M	FL unilateral incompleta esquerda	1			46, XY
39	F	FLP completa unilateral direita	1			46,XX
40	M	FLP	1	FLP fenda labial unilateral esquerda incompleta com fenda de palato duro e mole completa	polidactia pós axial bilateral	46, XY

41	F	FL	2			46,XX
42	F	FLP	1	fenda de palato duro e mole com fenda labial bilateral		46,XX
43	M	FLP	1			46, XY
45	M	FLP	1	fenda labial completa unilateral esquerda e fenda de palato duro e mole		46, XY
46	M	FLP	1	fenda labial unilateral de palato duro e mole completo		46, XY
47	M	FLP	1	fenda de lábio bilateral e palato completa		46, XY
48	M	FLP	1			46, XY
49	F	FLP	1	Fenda de lábio unilateral com fenda de palato duro e mole		46,XX
50	F	FLP	1			46,XX
52	M	FLP	1			46, XY

## 5. 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 vacuneteiner 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 ressuspê-lo em 200-250µL de TE 1x.

**6. ANEXO VI. Componentes e volumes das reações de PCR para amplificação dos exons do gene *BMP4***

**Exon 4**

**Tabela 1.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 4

<b>Reagente</b>	<b>Volume</b>
ddH <sub>2</sub> O	7,7µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	1µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	1,4µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

**Exon 5 fragmento 1**

**Tabela 2.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 5.1

<b>Reagente</b>	<b>Volume</b>
ddH <sub>2</sub> O	9,0µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,6µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,5µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

## Exon 5 fragmento 2

**Tabela 3.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 5.2

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	8,6µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,6µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,9µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl



7. ANEXO VII. Componentes e volumes das reações de PCR para amplificação dos exons do gene *TFAP2A*

**Exon 1**

**Tabela 1.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 1.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	8,7µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,6µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,8µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

**Exons 5, 10**

**Tabela 2.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 5,10.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	9µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,6µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,5µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

**Exon 6**

**Tabela 3.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 6.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	8,4µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	1,0µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,7µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

### Exon 7

**Tabela 4.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 7.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	8,9µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,6µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,6µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

### Exon 9

**Tabela 5.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 9.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	8,8µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,6µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,7µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

## Exon 11

**Tabela 6.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 11.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	μl
Tampão (10X)	1,5μl
MgCl <sub>2</sub> (25μM)	μl
dNTP (2μM)	1,5μl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35μl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35μl
DMSO <sub>4</sub>	μl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2μl
DNA (200ng/μl)	1μl

## Exons 12, 13 e 14

**Tabela 7.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 12, 13 e 14.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	9,5μl
Tampão (10X)	1,5μl
MgCl <sub>2</sub> (25μM)	0,6μl
dNTP (2μM)	1,5μl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35μl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35μl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2μl
DNA (200ng/μl)	1μl

## Exon 15

**Tabela 8.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 15

<b>Reagente</b>	<b>Volume</b>
ddH <sub>2</sub> O	8,4µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,8µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,9µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

## Exon 16

**Tabela 9.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 16

<b>Reagente</b>	<b>Volume</b>
ddH <sub>2</sub> O	8,5µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	1,0µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,6µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl