



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

YASKARA SANJINES PEÑA

**AVALIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS A FISSURAS LABIAIS
E/OU PALATINAS NÃO SINDRÔMICAS EM ELEMENTOS CIS-REGULATÓRIOS
DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL HUMANA.**

Piracicaba

2022

YASKARA SANJINES PEÑA

**AVALIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS A FISSURAS LABIAIS
E/OU PALATINAS NÃO SINDRÔMICAS EM ELEMENTOS CIS-REGULATÓRIOS
DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL HUMANA.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestra em
Biologia Buco-Dental, na Área de
Histologia e Embriologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA YASKARA
SANJINES PEÑA E ORIENTADA PELO
PROF.DR. MARCELO ROCHA MARQUES**

Piracicaba

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Sanjines Peña, Yaskara, 1989-
Sa58a Avaliação de variantes genéticas associadas a fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas em elementos cis-regulatórios de células da crista neural humana / Yaskara Sanjines Peña. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Marcelo Rocha Marques.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fenda labial. 2. Fenda palatina. 3. Fendas orofaciais. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único. 5. Elementos facilitadores genéticos. I. Marques, Marcelo Rocha, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of genetic variants associated with non-syndromic cleft lip and/or palate in cis-regulatory elements of human neural crest cells

Palavras-chave em inglês:

Cleft lip

Cleft palate

Orofacial clefts

Single nucleotide polymorphism

Enhancer elements, genetic

Área de concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Mestra em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Marcelo Rocha Marques [Orientador]

Rui Barbosa de Brito Júnior

Manuel Alexander Jara Espejo

Data de defesa: 26-04-2022

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4317-3190>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3003394245548457>



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 26 de abril de 2022, considerou a candidata YASKARA SANJINES PEÑA aprovada.

PROF. DR. MARCELO ROCHA MARQUES

PROF. DR. RUI BARBOSA DE BRITO JÚNIOR

PROF. DR. MANUEL ALEXANDER JARA ESPEJO

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATORIA

Dedico este trabalho a minha família por me acompanhar em momentos felizes, por serem a minha força em momentos difíceis e por acreditar sempre em mim.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001

A Deus e os Anjos por serem luz e guia na minha vida.

Ao Professor Dr. Marcelo Rocha Marques, pela orientação, apoio, disposição e ensino durante a execução do trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, à Presidente do programa de Pós-graduação em Odontologia da FOP UNICAMP Profa. Dra. Karina Gonzales Silverio Ruiz, ao Coordenador do programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-dental Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques, agradeço a oportunidade de poder fazer parte, como aluna de pós-graduação desta renomada universidade.

A minha família no Peru que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos meus amigos peruanos e brasileiros que a vida me permitiu conhecer e muitos deles se tornaram minha família em Piracicaba, obrigada por os momentos que a gente compartilhou e por ter sempre me apoiado.

Aos professores da área de Histologia e Embriologia pelo ensino e paciência, obrigada por me tornar a profissional que sou hoje.

RESUMO

Fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas (NSCLP) são deformidades congênitas comuns com etiologia multifatorial e complexa envolvendo fatores ambientais e genéticos. Variantes genéticas em elementos cis-regulatórios preferencialmente dentro de *enhancers* já foram demonstradas ter associação com diversas doenças. Além disso, já foram documentadas variantes genéticas em elementos cis regulatórios como agentes causais de más-formações craniofaciais. Por exemplo, já se identificaram variantes associados com NSCLP numa região enhancer que regula a expressão do gene p63, gene importante no desenvolvimento craniofacial, tais variantes eliminam a função do enhancer, causando a expressão deficiente de p63 e a presença de más-formações craniofaciais. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar se existe variantes genéticas previamente associadas a NSCLP, que estejam localizadas em enhancers de células da crista neural humana, células que, dentre outras funções, originam tecidos ectomesenquimais orofaciais. O estudo foi qualitativo, analítico e retrospectivo; onde 751 variantes associadas a NSCLP foram obtidas do catálogo GWAS, PUBMED e DISGENET, e em seguida foram inseridas nos navegadores ENSEMBL, UCSC GENOME BROWSER HOME, NCBI, VISTA ENHANCER BROWSER, e STAMP para avaliações quanto: marcações nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq envolvidos com a atividade enhancer de células da Crista Neural, a presença de sítios de ligação para Fatores de Transcrição (FT), ao tipo de variante, ao gene mapeado, a predição da atividade enhancer in vivo em camundongos transgênicos, e ao estudo de motifs. Observou-se que 11% do total das variantes teve algum tipo de marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq relacionados à atividade enhancers, em células da Crista Neural Humana com as marcações em histonas mais frequentes de H3K27ac, H3K4me1, H3K4me3 acontecendo principalmente nas variantes intrônicas. Na avaliação de sobreposição das marcações, as mais frequentes foram: H3K27ac - H3K4me1. 36% dessas variantes se encontravam em sequências de ligação para TF. Os genes com maior número de variantes foram: TFAP2A, MSX1, PAX7, AXIN2, BMP4, SUMO1 e IRF6, sendo TFAP2A o gene top com 6 variantes intrônicas, 2 exônicas e 1 variante intergênica. Do total das variantes associadas a fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas, 2 variantes estavam inseridas em regiões que exibiram atividade de enhancer in vivo detectadas na região craniofacial por meio da geração de camundongos transgênicos. Como conclusão, as análises evidenciaram

que existem variantes genéticas associadas a NSCLP que estão localizadas em enhancers de células da crista neural humana.

Palavras chave: fissura labial, fissura palatina, fissura orofacial, enhancer, snp

ABSTRACT

Non-syndromic cleft lip and/or palate (NSCLP) are common congenital malformations with a multifactorial and complex etiology involving environmental and genetic factors. Genetic variants in cis-regulatory elements, preferentially within enhancers, have been shown to be associated with several diseases. In addition, genetic variants in cis-regulatory elements have already been documented as causative agents of craniofacial malformations during embryonic development. For example, variants associated with NSCLP have already been identified in an enhancer region that regulates the expression of the p63 gene, an important gene in craniofacial development, these variants eliminate the function of the enhancer, causing deficient expression of p63 and the presence of craniofacial malformations. The objective of this study was to evaluate the genetic variants associated with NSCLP in human neural crest cell enhancers, cells that, among other functions, originate orofacial ectomesenchymal tissues. The study was qualitative, analytical, and retrospective. 751 variants previously associated with non-syndromic cleft lip and/or palate were obtained from the GWAS catalog, PUBMED, and DISGENET, and then the variants were inserted in the ENSEMBL, UCSC GENOME BROWSER HOME, NCBI, VISTA ENHANCER BROWSER, and STAMP database to evaluate the histone ChIP-seq and ATAC-seq data marks involved in the enhancers activity of neural crest cells, the presence of transcription factors binding sites, the type of variant, the mapped gene, the prediction of enhancer activity in vivo in transgenic mice, and the study of motifs. It was observed that 11% of the total variants had some type of the histone ChIP-seq and ATAC-seq marks related to the activity of human neural crest cells enhancers. The most frequent histone marks of H3K27ac, H3K4me1, H3K4me3 mostly occurring in the intronic variants. The evaluation of overlapping marks, the most frequent were: H3K27ac – H3K4me1. 36% of these variants were found in binding sites for Transcription Factors. The genes with the highest number of variants were: TFAP2A, MSX1, PAX7, AXIN2, BMP4, SUMO1, and IRF6, with TFAP2A being the top gene with 6 intronic, 2 exonic, and 1 intergenic variant. From those variants associated with non-syndromic cleft lip and/or palate, 2 variants were inserted into regions previously detected to have in vivo enhancer activity detected in the craniofacial area through in transgenic mice. It can be concluded that there are genetic variants associated with non-syndromic cleft lip and/or palate localized in human neural crest cell enhancers.

Key-words: cleft lip, cleft palate, orofacial cleft, enhancer, snp

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Distribuição da localização das variantes genéticas associadas NSCLP em diferentes regiões do genoma 43
- Figura 2-** Distribuição das variantes genéticas associadas a NSCLP segundo a marcação nos motifs para FT e marcações nos dados de ChIP-seq de histona e ATAC-seq para enhancer em células da crista neural humana. 43
- Figura 3-** Distribuição das variantes genéticas associadas a NSCLP que se encontram em sequencias motifs para FT. 44
- Figura 4-** Distribuição da localização das variantes que tiveram alguma marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural. 44
- Figura 5-** Distribuição da marcação para FT das variantes que tiveram alguma marcação de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural. 45
- Figura 6-** Distribuição das variantes segundo as marcações nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural. 46
- Figura 7-** Distribuição de número de variantes com marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural segundo as suas regiões de localização. 46
- Figura 8-** Gráfico de Venn, número de sobreposições das marcações das variantes que tiveram marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural. 47
- Figura 9-** Número das variantes nos genes, ou próximo a eles, mapeados das variantes que tiveram marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural. 48
- Figura 10-** Distribuição do total das variantes associadas a NSCLP avaliadas no banco de dados VISTA ENHANCER BROWSER. 49

Figura 11- Avaliação dos motifs com as variantes associadas a NSCLP que tiveram marcação nos dados de CHIP-seq de histona e ATAC-seq para enhancers de células da Crista Neural no STAMP.

LISTA DE ABREVIACÕES

NSCLP: Fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas

CCN: Celulas de crista neural

CCNH: Celulas de crista neural humana

SNP: Polimorfismos de nucleotídeos únicos

TN: Tubo neural

FT: Fatores de transcrição

CPM: Mesoderma paraxial craniano

EMT: Transição epitelial para mesenquimal

VWS: Síndrome de Van der Woude

RISC: Complexo de silenciamento induzido por RNA

GTF: Fatores gerais de transcrição

CP: Fissura palatina

CL: Fissura labial

CL ±CP: Fissura labial com ou sem fissura palatina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
5 RESULTADOS	42
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	80
Anexo 1- Verificação de originalidade e prevenção de plágio	80
Anexo 2- Variantes associadas a fissuras labiais e/ ou palatinas	81
Anexo 3- Variantes com marcação em ChIP-seq e ATAC-seq para enhancer	81
Anexo 4 - Imagens do Genoma Browser	81

1 INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento embrionário, a face começa se formar no final da quarta semana, com o desenvolvimento de processos ou proeminências faciais, consistindo principalmente de mesênquima derivado da crista neural, chamada também quarta capa germinativa (Sadler,2019). As células da crista neural são pluripotentes (Zalc et al.,2021), estas delaminam-se de sua origem e migram para diversas partes do corpo para se diferenciarem em vários tipos celulares, incluindo células do sistema nervoso periférico, melanócitos, cartilagem craniana, osso, células neuroendócrinas, células de tecidos (Mendez et al.,2020). Durante o processo de desenvolvimento podem ocorrer algumas alterações as quais tem o potencial de acarretar má-formação de alguma estrutura anatômica. Os defeitos na face ou outras alterações decorrentes de processos patológicos ou traumas têm consequências importantes, além de seus efeitos físicos; como aflições psicológicos, sociais e econômicos para os afetados e suas famílias (Ji et al.,2020; Moore,2013).

Os defeitos mais comuns que causam uma aparência facial anormal, dificuldades de fala, ingestão de alimentos, infecções frequentes do ouvido médio e defeitos dentais são as fissuras orofaciais, que podem se apresentar associadas a uma síndrome ou de forma isolada, que são chamadas fissuras não sindrômicas. Estas se apresentam em, aproximadamente, 1 de cada 700 nascidos ou uma faixa de 0,5–2,6 por 1.000 nascidos vivos. Isso se traduz em cerca de 220.000 bebês por ano nascidos com fissuras orofaciais não sindrômicas no mundo (Ji et al.,2020; Worley et al.,2018; Sadler,2019), epidemiologicamente 85% são fissuras labiais com ou sem fissura palatina, e em torno de 45% são fissuras palatinas isoladas (Deshpande & Goudy,2018; Jones,1988), as quais apresenta-se com maior incidência nas populações asiáticas e indígenas americanas. Já nas populações caucasianas se apresentam com uma incidência intermediária, e nas populações africanas com a menor incidência (Deshpande & Goudy,2018; Vandas,1987). No Brasil a prevalência média de fissuras labiais e/ou palatinas é de 5,86 por 10.000 nascidos vivos, sendo a região Sul que apresenta a maior prevalência, enquanto o Nordeste tem a menor (Silva et al.,2018; Sousa & Roncalli, 2017).

A etiologia das fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas (NSCLP) é multifatorial, complexa e abrange fatores genéticos e ambientais (Worley et al., 2018).

Com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento do genoma humano, foram identificados vários polimorfismos de nucleotídeos únicos (snp- single nucleotide polymorphism) que se mostraram estar associados ao fenótipo das fissuras orofaciais, contribuindo na sua etiologia multifatorial (Cardenas et al.,2019).

Variações em regiões não codificantes tem sido importante na determinação de condições fenotípicas normais bem como estão envolvidas com a patogênese de doenças humanas (Franke et al.,2016; Laugsch et al.,2019; Lupiáñez et al.,2015). Por exemplo, variações nas sequências de enhancers, que são elementos cis-reguladores frequentemente encontrados em regiões não codificantes, já foram documentados serem agentes causais de má-formação durante o desenvolvimento (Spitz,2016; Long,2020). Embora as mutações em sequências de codificação de proteínas geralmente afetem vários tecidos nos quais um determinado gene está ativo, as mutações em regiões regulatórias não codificantes podem alterar seletivamente a expressão do gene alvo em contextos de tecido específicos (Long et al.,2020). Por exemplo, na identificação de uma variante numa região enhancer que regula a expressão do gene KRT8 em células epiteliais orais humanas. O gene KRT18 é expresso em muitos epitélios além da periderme como o ectoderma da superfície embrionária (Liu et al.,2020). Outro exemplo é na identificação de SNPs associados com NSCLP numa região enhancer que regula a expressão do gene p63, gene importante no desenvolvimento craniofacial, tais SNPs eliminam por completo a função do enhancer. (Lin-Shiao et al.,2019),

Embora muitos genes e SNPs já foram documentados estarem associados a má-formações craniofaciais, ainda há muito a ser entendido sobre os mecanismos que tais genes e SNPs levam ou participam da patogênese destas doenças. A hipótese levantada do nosso estudo é que existem polimorfismos de nucleotídeos únicos associados a NSCLP que poderiam estar inseridos em regiões não codificantes, e que sejam elementos *enhancers* de células da crista neural humana (CCNH).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESENVOLVIMENTO CRANIOFACIAL

2.1.1 CELULAS DA CRISTA NEURAL

No desenvolvimento embrionário em vertebrados, um dos principais eventos após o processo de gastrulação é a neurulação, que permite a formação do tubo neural (TN) (Mendez et al.,2020). Com a formação do TN, o ectoderma neural gera o sistema nervoso central (SNC) e outro conjunto de células chamadas de células da crista neural (CCN) localizadas na parte mais dorsal do TN (Hall,2008; Simões-Costa et al.,2015). Essa população de células versáteis e plásticas foram descritas pela primeira vez por Wilhelm His há 150 anos (Hall,1999).

As CCN dependendo do local de sua origem ao longo do eixo anteroposterior do embrião, podem ser classificadas em CCN craniais, troncais (incluindo cardíaco), vagais e sacrais (Minoux & Rijli,2010; Simões-Costa & Bronner,2013; Vega-Lopez et al.,2018).

As CCN são pluripotentes (Zalc et al.,2021), porém podem se diferenciar em vários tipos de células, incluindo células do sistema nervoso periférico, melanócitos, cartilagem craniana e osso, células neuroendócrinas e vários outros fenótipos. Em humanos, pelo menos 47 tipos de células foram definidos como derivados de CCN (Vickaryous & Hall,2006), porém as CCN são consideradas a 4º camada germinativa (Sadler,2019).

O desenvolvimento das CCN inclui indução, delaminação, migração, diferenciação e proliferação (Ji et al.,2019).

- **INDUÇÃO DE CCN:** As células da crista neural são induzidas na interface entre a placa neural e o ectoderma não neural, uma região conhecida como borda da placa neural (NPB) (Ji et al.,2019). Moléculas Wnt morfogenéticas expressas em NPB, tubo neural dorsal e mesoderme paraxial mostraram induzir a formação de CCN (Ji et al., 2019).
- **DELAMINAÇÃO DE CCN:** Após a indução, as CCN passam por uma transição epitelial-mesenquimal (EMT) e se delaminam do tubo neural (Ji et al.,2020). Durante a delaminação, as CCN ajustam sua adesão intercelular e obtêm a capacidade de migração (Ji et al.,2019).

- **MIGRAÇÃO DE CCN:** Foi demonstrado que várias moléculas de sinalização regulam a motilidade do CCN, como Rho, caderinas, Wnt, Bmp, Fgf e Yap (Chalpe et al.,2010; Clay et al.,2011; De Calisto et al.,2005; Kumar et al.,2019; Martinez et al.,2011). Em vez de migrar aleatoriamente, as CCN seguem correntes de migração segregadas em direção a do processo frontonasal, 1° e 2° arco faríngeo (Lumsden et al.,1991). Acredita-se que o posicionamento adequado das CCN seja determinado pela atividade do gene Hox e é influenciado pelos rombômeros específicos dos quais as CCN surgiram. Por exemplo, as CCN originários dos rombômeros 2 e 3 do rombencéfalo e sem expressão do gene Hox irão migrar para o 1° arco faríngeo (Lumsden et al.,1991; Ji et al.,2020).
- **DIFERENCIAÇÃO DE CCN:** Duas teorias notáveis foram propostas para descrever a diferenciação das CCN. A primeira teoria sugere que as CCN são intrinsecamente programadas, isso pressupõe que cada um das CCN contém um "programa" molecular para o padrão facial e que carregam essa informação de padrão molecular com eles após a saída do tubo neural e que determina a estrutura em que eles se desenvolverão (Noden,1983; Cordero et al.,2011). Porém as CCN retêm sua multipotência mesmo nos estágios embrionários tardios do desenvolvimento, o que pode explicar por que os teratógenos podem exercer seus efeitos adversos mesmo no final da gestação humana (Cordero et al.,2011). A segunda teoria sugere que as CCN respondem à comunicação intercelular, adquirem informações de padrões faciais do ambiente em que eventualmente se encontram, da matriz extracelular e das células vizinhas, e a interação das CCN com as células circundantes influencia o destino das CCN (Del Barrio & Nieto, 2002, Cordero et al.,2011). Nas proeminências orofaciais, o mesênquima derivado de CCN é coberto por epitélio e contém um núcleo do mesoderma paraxial craniano (CPM) com células precursoras musculares (Chai & Maxson,2006; Graham,2003). O desenvolvimento coordenado do esqueleto facial derivado de CCN e sua musculatura derivada do CPM associada contribui para a formação de estruturas orofaciais funcionais. Portanto, as interações entre células epiteliais, CCN e células CPM são consideradas críticas para o padrão craniofacial e diferenciação de CCN (Cordero et al.,2011). A interrupção dessas interações pode causar fissuras labiais e/o palatinas e outras malformações craniofaciais (Twigg & Wilkie, 2015; Ji et al.,2020).

- **PROLIFERAÇÃO:** Uma vez nas proeminências faciais, as CCN proliferam e as estruturas faciais começam a tomar forma (Cordero et al.,2011; Kaucka et al.,2016). Foi demonstrado que muitas vias de sinalização estão envolvidas na regulação da proliferação de CCN, incluindo Wnt e Shh, e a interrupção dessas vias causa defeitos craniofaciais, incluindo fissuras labiais e/o palatinas (Jeong et al.,2004 ; Ji et al.,2019).

2.1.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONARIO DA FACE

O desenvolvimento da face humana ocorre entre a quarta e a décimo segunda semana de vida intrauterina (Deshpande & Goudy,2018). Nos vertebrados as CCN craniais emergem das regiões do prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (Couly & Le Douarin,1987 ; Serbedzija et al.,1992). Nesses locais, eles constituem todo o viscerocrânio (face) e partes das regiões membranosas e cartilaginosas do neurocrânio (crânio). Eles também constituem o resto dos tecidos nessas regiões, incluindo cartilagem, osso, dentina, tendões, derme, pia-máter e aracnóides, neurônios sensoriais e tecido conjuntivo glandular (Sadler,2019).

Na quarta semana de desenvolvimento embrionário, as CCN se delaminam e migram ventralmente para os arcos faríngeos (1°,2°,3°;4°) para o desenvolvimento da face e pescoço, neste estágio cinco protuberâncias faciais se formam ao redor do estomodeu: a proeminência frontonasal, 2 processos maxilares e 2 processos mandibular pareados; os processos maxilares e mandibulares têm sua base de desenvolvimento no primeiro arco faríngeo (Hovorakova et al.,2018; Couly & Le Douarin,1987; Serbedzija et al.,1992).

Na quinta semana de desenvolvimento embrionário, a proeminência frontonasal que desce na linha média do prosencéfalo dá origem a processos nasais mediais e laterais pareados. Os processos nasais medial e lateral circundam a placa nasal (epitélio olfatório prospectivo do nariz). À medida que os processos nasais aumentam ao redor de cada placa nasal, eles formam um fosso (o primórdio da narina e das cavidades nasais) com a placa nasal persistindo na parte inferior das narinas. À medida que cresce, dois processos nasais mediais adjacentes se fundem no plano medial para criar o filtro, o lábio superior medial, a ponta nasal, a columela e o palato primário, e

os processos nasais laterais se fundem para criar a face lateral do nariz (Deshpande & Goudy,2018).

As proeminências maxilares emparelhadas crescem dos lados laterais em direção à linha média para se juntar à proeminência frontonasal, dando origem às bochechas e ao lábio superior lateral (Deshpande & Goudy,2018).

A palatogênese ocorre durante as semanas 5 a 12 de desenvolvimento. O palato primário, que inclui o arco alveolar maxilar central com os quatro dentes incisivos e o palato duro anterior ao forame incisivo, primeiro se desenvolve a partir da expansão rápida da proeminência frontonasal e da fusão das proeminências nasais mediais. O palato secundário então se desenvolve a partir da fusão dos processos palatinos alongadas adjacentes à língua e, conforme a mandíbula cresce, a língua desce para a cavidade oral, permitindo que os processos palatinos do palato se alonguem e subam acima da língua. Os processos palatinos se fusionam com o palato primário e os palatos primário e secundário se fusionam com o septo nasal, a fusão do palato ocorre de uma direção anterior para posterior, começando no forame incisivo e concluindo com a fusão uvular ocorre da 8ª a 12ª semanas de desenvolvimento embrionário (Hovorakova et al.,2018; Deshpande & Goudy ,2018). A palatogênese é complexa e envolve muitos processos celulares, incluindo a proliferação de células mesenquimais e epiteliais, transição epitelial para mesenquimal (EMT), migração celular, apoptose, transdução de sinalização através dos cílios primários e interação com a matriz extracelular (Yu et al.,2005; Zhang et al.,2002).

Os processos mandibulares se fundem na linha média, formando o lábio inferior e o arco da mandíbula. Tonge (1967) afirmou que a fusão dos processos faciais deveria estar completamente concluída até o 38º dia embrionário em humanos (Hovorakova et al.,2018; Deshpande & Goudy,2018).

Qualquer tipo de defeito ou alteração dos processos normais de desenvolvimento craniofaciais podem causar diferentes doenças como as fissuras labiais e/ou palatinas.

2.2 FISSURAS LABIAIS E/OU PALATINAS

As fissuras labiais e/o palatinas são anomalias congênitas comuns que resultam de defeitos dos processos faciais no desenvolvimento ou na fusão

adequadamente durante o desenvolvimento embrionário inicial (da quarta à décima segunda semana de gestação) (Deshpande & Goudy, 2018). As fissuras labiais e/o palatinas podem ser classificadas como:

2.2.1 FISSURAS LABIAIS E/OU PALATINAS SINDRÔMICAS

A designação das fissuras orofaciais como síndrômicas geralmente se baseia na presença de anormalidades físicas ou cognitivas adicionais. Pelo menos 275 síndromes, nas quais a fissura orofacial é uma característica primária, foram identificadas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>) e são causadas por mutação de um único locus genético, anormalidades cromossômicas ou teratógenos. Das síndromes descritas, 75% têm uma causa genética conhecida, incluindo centenas de síndromes devido à herança mendeliana em um único locus genético (Leslie & Marazita, 2013).

2.2.2 FISSURAS LABIAIS E/OU PALATINAS NÃO SINDRÔMICAS

As fissuras labiais e/ou palatinas não síndrômicas (NSCLP) são encontradas como defeitos isolados quer dizer que carecem de características adicionais. A etiologia das NSCLP é multifatorial e complexa e inclui fatores genéticos e ambientais (Li et al., 2019). Se apresenta em 1 de cada 700 recém-nascidos ou uma faixa de 0,5 a 2,6 por 1.000 nascidos vivos, isso se traduz em aproximadamente 220.000 bebês por ano que nascem com fissuras labiais e/o palatinas não síndrômicas (Mossey et al., 2011; Li et al., 2020). No Brasil, estudos recentes indicam que a prevalência média de NSCLP é de 5,86 por 10.000 nascidos vivos, mas essas taxas variam entre os diferentes estados. A região Sul apresenta a maior prevalência, enquanto o Nordeste tem a menor. Nos últimos anos, no entanto, houve uma tendência de aumento na prevalência de NSCLP relatada nas regiões norte e nordeste (Silva et al., 2018; Sousa & Roncalli, 2017). As crianças nascidas com esta malformação sofrem de graves problemas de alimentação, dificuldades de fala, infecções frequentes do ouvido médio e defeitos dentais (Mossey et al., 2009). Embora as fissuras possam ser reparadas cirurgicamente, os pacientes geralmente são submetidos a múltiplas cirurgias craniofaciais e odontológicas, bem como fonoaudiologia. Apesar dessas intervenções, os pacientes podem experimentar efeitos psicossociais ao longo da vida da malformação. De fato, os indivíduos nascidos com fissura têm maior incidência de problemas de saúde mental e maiores taxas de mortalidade em todas as fases da vida (Christensen et al., 2004; Wehby & Cassell, 2010; Leslie & Marazita, 2013). A fissura

também está associada a um risco maior de vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama, cérebro e cólon, no indivíduo com fissura, bem como em seus familiares (Zhu et al.,2002; Bille et al.,2005; Menezes et al., 2009; Dietz et al.,2012; Leslie & Marazita,2013).

2.2.2.1 EPIDEMIOLOGIA

85% são CL $\pm$ CP, e aproximadamente 45% são CP isoladas (Deshpande & Goudy,2018; Jones,1988). A taxa de incidência de fissuras labiais e/o palatinas não sindrômicas em nascidos vivos, natimortos e abortos, varia de acordo com a raça; as populações asiáticas e indígenas americanas têm a maior incidência com 0,79 para 4,04 por cento. 1000, as populações caucasianas têm uma incidência intermediária com 0,91 a 2,69 por 1000 e as populações africanas têm a menor incidência com 0,18 a 1,67 por 1000 (Deshpande & Goudy,2018; Vanderas,1987). A presença das fissuras labiais e/ou palatinas é duas vezes mais comum em homens do que em mulheres, enquanto as fissuras palatinas são duas vezes mais comuns em mulheres (Mossey et al.,2009; Leslie & Marazita,2013).

2.2.2.2 CLASIFICAÇÃO DAS FISSURAS LABIAIS E/OU PALATINAS NÃO SINDRÔMICAS

As fissuras labiais e/o palatinas são classificadas por lateralidade e integridade, com este esquema de classificação baseado no desenvolvimento embriológico. A fissura labial pode ser unilateral ou bilateral. Aproximadamente 75% das fissuras labiais são unilaterais, entre as fissuras unilaterais, as fissuras do lado esquerdo são duas vezes mais comuns que as fissuras do lado direito (Gundlach & Maus, 2006; Leslie & Marazita,2013). A fissura labial também pode ser completa, na qual a fissura cobre toda a espessura do lábio superior e na qual a crista alveolar geralmente também tem fissura; A fissura labial é incompleta quando tem um segmento variável contínuo através da fissura chamada de banda de Simonart que é uma banda de tecido labial que se junta à região da fissura. A fissura palatina também é descrita como unilateral ou bilateral e completa ou incompleta. No entanto, eles também são classificados com base na localização da fissura em relação ao forame incisivo, as fissuras localizadas antes do forame incisivo são chamadas de fissuras do palato primário e as que estão detrás do forame incisivo são chamadas de fissuras do palato

secundário. Também pode ocorrer fissura palatina do tecido mole de forma isolada ou apenas úvula bífida (Deshpande & Goudy,2018).

2.2.2.3 GENETICA MOLECULAR DE FISSURAS LABIAIS E/OU PALATINAS NÃO SINDROMICAS

A identificação de genes que contribuem às NSCLP tem sido objeto de décadas de pesquisa, usando uma variedade de abordagens por exemplo, a análise de ligação, rearranjos genômicos, genes candidatos, estudos de associação genômica GWAS (Dixon et al.,2011; Maracite 2012; Leslie & Marazita,2013). Onde se identificaram mais de 350 genes que têm associações síndrômicas e/ou não síndrômicas de fissuras orofaciais em humanos (Funato & Nakamura,2017), mais de 300 genes foram implicados na fusão palatina em modelos experimentais humanos e animais e SNPs podem causar fissuras (Deshpande & Goudy,2018). No entanto, a etiologia das fissuras labiais e/o palatinas ainda é pouco compreendida com as múltiplas vias moleculares associadas a fissuras labiais e/o palatinas. As vias moleculares mais comumente estudadas incluem aquelas envolvidas com fatores de sinalização extracelular, fatores de transcrição e moléculas de adesão celular (Levi et al.,2011; Deshpande & Goudy,2018).

- **VIAS DE TGF- β e BMP:** A superfamília do fator de crescimento transformador- β (TGF β) é composta pela família do fator de crescimento transformador-beta, bem como outras famílias, incluindo proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de crescimento e diferenciação (GDF), ativinas (ACTs) e inibinas (INH). A família TGF β consiste em três isoformas, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, que são moléculas de sinalização importantes para mediar muitos eventos no crescimento e desenvolvimento normais (Kingsley,1994; Poniatoski et al., 2015). Esses fatores de crescimento são secretados por células e os fatores são ligados por receptores adjacentes, que então enviam sinais intracelularmente por meio de proteínas citoplasmáticas pertencentes à família Smad (Inman,2005), receptores Tgf β R1 e Tgf β R2 fosforilam SMAD 2/3 (Inman et al.,2002). Esse complexo é então transportado para o núcleo, onde são induzidas alterações transcricionais (Deshpande & Goudy, 2018). Tgf β R3 liga todos os três ligantes Tgf β , bem como BMP2. A perda de Tgf β R3 resulta na elevação e alongamento dos processos palatinos interrompida e interferida e

também leva à expressão atípica das vias de sinalização de TGF β e BMP dentro dos processos palatinos (Hill et al., 2015). Como os TGF β 1 e 2 demonstraram ter um efeito na indução da condrogênese e da osteogênese, o conhecimento dessas mutações genéticas em um paciente com fissura pode auxiliar no planejamento cirúrgico e na previsão de possíveis complicações após o reparo (Joice et al., 1995). O Tgf β 3, que é expresso nas células epiteliais da borda medial, participa de vários processos celulares, incluindo a transformação epitelial em mesenquimal, bem como a morte celular programada do epitélio da borda medial do palato. Foi demonstrado que os camundongos sem Tgf β 3 exibem agenesia pulmonar e fissura palatina devido à má adesão do epitélio da borda medial e remoção da costura epitelial da linha média (Proetzel et al., 1995). A deleção condicional de Tgf β 3 do epitélio da borda medial foi associada apenas à formação de fissura palatina, e a correção desta por técnicas in vitro reverteu o fenótipo da fissura palatina (Deshpande & Goudy, 2018).

- **SHH, FGF10, BMP E MSX1:** O gene Sonic hedgehog (Shh) faz parte da família de genes Hedgehog, que codifica proteínas importantes para a interação célula-célula e é necessário para o desenvolvimento palatal e frontonasal (Tapadia et al., 2005). Shh é um alvo a jusante do fator de crescimento de fibroblastos 10 (Fgf10) e seu receptor Fgfr2b, que sinaliza durante o desenvolvimento do palato. Shh foi encontrado para ser expresso predominantemente em locais de interações epitélio-mesenquimal e é de vital importância para a indução de primórdios faciais, particularmente o processo frontonasal. A perda de Shh está associada a defeitos faciais da linha média, incluindo holoprosencefalia, bem como formação de fissura palatina, e também é expressa no epitélio da borda medial (Bitgood et al., 1995). Foi demonstrado que Shh expresso epitelialmente sinaliza diretamente o crescimento regular do palato para o mesênquima, enquanto a sinalização Shh regula a expressão de Bmp2, Bmp4, Msx1 e Fgf10 no mesênquima palatal adjacente. Em contraste, a inativação de *smoothed* (Smo), uma proteína envolvida na via de sinalização hedgehog, no mesênquima palatino afetou a proliferação das células epiteliais palatinas (Lan et al., 2009). A proteína 4 morfogênica óssea (Bmp4) é expressa no mesênquima e no epitélio da plataforma palatina, em áreas semelhantes ou vizinhas onde Shh é expresso (Bitgood et al., 1995).

Mutações BMP também foram associadas à fissura palatina; por exemplo, a mutação BMPR1B causa a sequência de Pierre Robin (Yang et al., 2017). Os receptores do fator de crescimento de fibroblastos foram associados a várias formas de craniossinostose sindrômica que incluem uma fissura palatina característica, incluindo a síndrome de Apert (FGF2) e a síndrome de Crouzon (FGF2, FGF3) (Wilkie et al., 1995; Reardon et. al 1999; Meyers et al., 1995). A síndrome de Apert é caracterizada por malformações craniofaciais, incluindo testa plana, retração média da face, fissura palatina e hipertelorismo, dificuldade de aprendizagem, mobilidade articular deficiente e sindactilia simétrica severa dos dedos das mãos e dos pés, que é a característica distintiva da síndrome de Apert de outras síndromes relacionadas ao FGFR2. A síndrome de Crouzon também se apresenta com testa plana, hipoplasia do meio da face e fissura palatina, mas está associada a deformidade facial menos grave em comparação com a síndrome de Apert e inteligência, mãos e pés normais (Ko,2016; Kreiborg et al., 1998). O gene homeobox Msx1 também é expresso na proeminência facial e é necessário para a expressão de Bmp2 e Bmp4 no mesênquima palatino e de Shh no epitélio da borda medial (Zhang et al.,2002). Msx1 regula o crescimento das proeminências maxilares (Medio et al.,2012). Camundongos deficientes em Msx1 apresentam fissura completa do palato secundário, juntamente com desenvolvimento maxilar anormal e processo alveolar ausente (Satokata et al.,1994). Além disso, descobriu-se que Msx1 regula a angiogênese na face em desenvolvimento; foi levantada a hipótese de que a angiogênese anormal leva a proeminências maxilares encurtadas em camundongos nulos Msx1 como resultado da diminuição do suprimento de oxigênio e nutrientes (Medio et al.,2012).

- **IRF6:** O fator regulador do interferon 6 (IRF6) pertence a uma família de nove fatores de transcrição que se ligam a sequências de DNA específicas e regulam a expressão gênica. Mutações em IRF6 foram identificadas pela primeira vez como etiológicas na síndrome de Van der Woude autossômica dominante, que pode incluir fissura labial com ou sem fissura palatina, ou fissura palatina isoladamente, juntamente com anomalias dentárias e fístulas labiais. Investigações posteriores mostraram que alelos comuns em IRF6 estavam associados a fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas, essa associação foi replicada independentemente em estudos de GWAS, bem como em muitos

estudos de genes candidatos. Um grupo de gêmeos monozigóticos que não correspondiam a VWS levou à identificação de uma mutação sem sentido em IRF6. Mutações IRF6 foram então identificadas em 45 famílias não relacionadas adicionais afetadas por VWS. A análise de expressão identificou altos níveis de mRNA de *Irf6* ao longo da borda medial do palato de fusão. O papel do IRF6 na fissura labial e/ou palatina é apoiado pela análise de modelos animais; os camundongos sem *Irf6* apresentavam múltiplas anormalidades no desenvolvimento epitelial com singnatia e mucosa esofágica fundida, destacando a importância da regulação transcricional do epitélio durante a formação da fissura labial e palatina. Esses resultados demonstraram que o IRF6 é um determinante chave da mudança de proliferação/diferenciação de queratinócitos e pesquisas subsequentes indicaram que o IRF6 também desempenha um papel fundamental na formação da periderme oral, cuja regulação espaço-temporal é essencial para garantir a adesão palatina adequada (Richardson et al.,2009; Dixon et al.,2011). Como o TGF- β 3, o *Irf6* também é expresso ao longo da borda medial do palato e o IRF6 pode estar envolvido na via de sinalização do TGF- β (Kondo et al.,2003). Pacientes com VWS demonstraram ter maior risco de complicações da ferida após o reparo da fissura, sugerindo que IRF6 desempenha um papel na cicatrização da ferida (Jones et al.,2010; Dixon et al.,2011). Uma abordagem que integra a identificação dos elementos cis usando conservação de sequência em várias espécies, análise de modelos animais e análises bioquímicas resultou na identificação de uma variante de sequência específica (rs642961) localizada dentro de um enhancer ~ 10 kb upstream do local de início de transcrição IRF6 que é significativamente supertransmitido apenas na fissura labial não sindrômica (Milunsky et al.,2008; Dixon et al.,2011). É importante ressaltar que esse aparente alelo de risco foi encontrado para romper um sítio de ligação para o fator de transcrição AP-2 α , que está mutado no distúrbio autossômico dominante de fissuras orofaciais na síndrome branquioculofacial (Weinberg et al., 2008; Dixon et al., 2011), sugerindo fortemente que é uma variante contribuinte. (Milunsky et al.,2008; Dixon et al.,2011). Recentemente, uma combinação de genética de camundongos, análises de expressão, imunoprecipitação de cromatina e ensaios de repórter de luciferase mostrou que IRF6 é um alvo direto de p63, que está subjacente a várias síndromes de

malformação que incluem fissuras labiais e/ou palatinas como uma característica marcante (Celli et al.,1999; McGrath et al.,2001; Dixon et al., 2011), p63 ativa a transcrição de IRF6 por meio de um elemento cis, o enhancer, variação dentro de ele aumenta a presença de apenas a fissura labial (Dixon et al.,2011).

- **MAFB:** O gene MAFB codifica um fator de transcrição de zíper de leucina básico. Marcadores próximos ao MAFB alcançaram significância em todo o genoma no estudo “GENEVA Cleft Consortium GWAS” (Beaty et al.,2010), com trios de ascendência asiática fornecendo evidências estatísticas muito mais fortes. Em amostras de replicação independente, 1149 pedigrees de ascendência europeia mostraram evidências de ligação e associação com um SNP (rs13041247, $p=0,0007$) localizado a 260 pb do SNP produzindo o sinal mais forte entre as famílias asiáticas (rs11696257, $p=0,0009$ em 331 pedigrees independentes). Uma mutação missense, H131Q, em MAFB foi encontrada em 3,5% dos filipinos com fissuras labiais e/ou palatinas, mas apenas 0,7% dos controles ($P < 0,0001$). Esta variante ocorre em uma região de sequência fortemente conservada, sugerindo que pode haver uma variante rara no MAFB que contribui para o sinal GWAS observado. É digno de nota que as regiões pobres em genes em ambos os lados do MAFB incluem numerosos sítios de ligação para fatores de transcrição conhecidos por desempenhar um papel no desenvolvimento do palato (incluindo fatores de transcrição nas famílias de genes MSX, IRF, SOX e BACH). No camundongo, a expressão de Mafb mostrou-se forte no epitélio das prateleiras palatinas e no epitélio da borda medial durante a fusão palatina (Beaty et al.,2010; Dixon et al.,2011).
- **PDGF:** O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e seus receptores PDGFR α e PDGFR β mostraram ser cruciais para a proliferação, sobrevivência e migração celular (Hoch et al.,2003). Pdgfc e Pdgfa, que codificam ligantes de PDGF, são expressos no epitélio do palato. PDGFR α , que codifica o receptor, é expresso no mesênquima (Ding et al.,2004). Camundongos mutantes PDGFR α demonstraram defeitos em derivados da crista neural que contribuem para o processo frontonasal e, subsequentemente, levam à fissura palatina. (Tallquist et al., 2003). Ambos os camundongos mutantes Pdgfc e Pdgfa desenvolveram fissuras, bolhas subepidérmicas, espinha bífida e outros defeitos esqueléticos e vasculares.

Camundongos Null Pdgfc apresentaram falha de elevação da prateleira palatina, com processos palatinos hipoplásicos e fusão inadequada. Os camundongos Pdgfa null exibiram um fenótipo de fissura palatina severa (Deshpande & Goudy, 2018).

- **TBX1:** O fator de transcrição T-box TBX1 é um mediador de anormalidades de desenvolvimento e tem se mostrado essencial para a elevação e alongamento palatinos normais (Goudy et al., 2010). Mutações foram associadas a fenótipos de Síndromes Velocardiofaciais e DiGeorge em camundongos (Jerome et al., 2001; Merscher et al., 2001). Embriões nulos de camundongos TBX1 exibiam fissura palatina, com prateleiras palatinas encurtadas que não podiam ser alongadas ou levantadas, bem como altura aumentada da musculatura da língua, 50% dos camundongos sem TBX1 demonstraram fusões palatal-orais, juntando-se ao palato posterior. Isso sugere que TBX1 também pode ser responsável pela manutenção da integridade epitelial no palato posterior (Goudy et al., 2010).
- **VEGFA:** O fator de crescimento endotelial vascular A, um fator de crescimento envolvido na angiogênese e ossificação, também demonstrou ser essencial para o desenvolvimento palatal. A deleção de VEGFa em células da crista neural craniana causou fissura palatina em camundongos, associada à largura da prateleira palatina reduzida e com prateleiras palatinas não alongadas e levantadas acima da língua. Esses camundongos também apresentaram desenvolvimento vascular anormal e menos ossificação dos ossos maxilares e palatinos (Hill et al., 2015).
- **ARHGAP29:** Múltiplos marcadores no cromossomo 1p22, localizados dentro e ao redor do gene ABCA4, que codifica um transportador de cassete de ligação de ATP, alcançaram significado genômico por GWAS (Beatty et al., 2010; Ludwig et al., 2012). Os SNPs mais fortemente associados replicados em populações independentes (Beatty et al., 2010; Lennon et al., 2012; Pan et al., 2011; Yildirim et al., 2012), que também mostrou um sinal mais forte nas famílias asiáticas do que nas famílias europeias. Mutações em ABCA4 causam várias doenças retinianas autossômicas recessivas (Tsybovsky et al., 2010). Apesar de identificar numerosas mutações missense neste gene em indivíduos com fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas, a expressão de Abca4 de camundongo foi restrita à retina nos níveis de RNA e proteína (Beatty et al.,

2010; Leslie et al., 2012), demonstraram a expressão craniofacial do gene adjacente *Arhgap29*, que foi reduzido em camundongos knockout para *Irf6*. A triagem de mutações *ARHGAP29* identificou várias variantes de codificação raras em famílias com fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas. *ARHGAP29* codifica a proteína 29 ativadora de Rho GTPase, uma proteína que medeia a regulação cíclica de pequenas proteínas de ligação ao GTP (Saras et al., 1997), que estão envolvidas em muitas funções críticas para o desenvolvimento craniofacial relacionadas à forma, movimento, interações célula-célula e proliferação (Mossey et al., 2009; Leslie & Marazita, 2013).

- **PAX7:** A proteína de caixa pareada Pax-7 (PAX7) é um fator de transcrição que no camundongo demonstrou ter um papel no desenvolvimento da crista neural, regulando a expressão dos marcadores da crista neural *Slug*, *Sox9* e *Sox10* (Basch et al., 2006). Pax7 é expresso nas prateleiras palatinas, cartilagem de Meckel e várias estruturas nasais, incluindo o epitélio nasal. Camundongos mutantes Pax7 apresentam malformações maxilares e nasais, confirmando seu papel no desenvolvimento craniofacial (Mansouri et al., 1996). Em humanos, vários marcadores em torno do PAX7 foram abordados com importância no genoma por GWAS (Beaty et al., 2010) e meta-análises (Ludwig et al., 2012), sugerindo um papel para variantes comuns do PAX7 na etiologia de fissuras labiais e/ ou palatinas não sindrômicas. Notavelmente, PAX7 foi previamente associado com as fissuras labiais e/ ou palatinas não sindrômicas em quatro populações em um estudo de associação de genes candidatos (Sull et al., 2009; Leslie & Marazita, 2013).
- **VAX1:** É um regulador transcricional contendo um domínio homeobox de ligação ao DNA. Marcadores em ou perto de VAX1 aproximaram-se da significância do estudo de genoma completo (Mangold et al., 2010) e o GENEVA Cleft Consortium GWAS (Beaty et al., 2010); esta associação foi replicada em três populações asiáticas independentes (Butali et al., 2013). O ressequenciamento de VAX1 não conseguiu identificar um excesso de variantes raras em NSCLP (Nasser et al., 2012). Vax1 é expresso em várias estruturas craniofaciais e camundongos deficientes para Vax1 desenvolvem fissura palatina (Hallonet, 1999). Recentemente, uma mutação homozigótica missense foi descrita em uma criança de uma família consanguínea com microftalmia bilateral, fissura labiopalatina bilateral e agenesia do corpo caloso,

imitando o fenótipo do camundongo *Vax1*^{-/-} (Slavotinek et al.,2012; Leslie & Marazita,2013).

2.2.3 DEFEITOS DE CCN COMO CAUSA DE FISSURAS LABIAIS E/O PALATINAS

Embora as CCN gerem muitos tipos de células e tecidos, elas existem apenas temporariamente durante o desenvolvimento embrionário. Portanto, é fundamental que os embriões produzam e mantenham CCN suficientes para migrar e se diferenciar no complexo craniofacial (Trainor, 2010; Ji et al.,2020). A interrupção da formação, migração, proliferação ou sobrevivência de CCN resulta em menos CCN em seus destinos finais, o que pode causar uma variedade de anormalidades craniofaciais, incluindo fissuras labiais e/o palatinas sindrômicas e não sindrômicas (Dixon et al., 2006; Jones et al.,2008; Q. Wang et al.,2019; Ji et al.,2020).

O desenvolvimento do lábio superior e palato depende principalmente do crescimento das proeminências orofaciais, atingir e manter a contagem celular adequada é de extrema importância para garantir estruturas faciais formadas corretamente (Yu et al.,2009; Ji et al.,2020). A proliferação de CCN pós-migratória defeituosa ou a frequência apoptótica anormal dentro das proeminências orofaciais podem afetar sua morfologia, o que pode resultar em fissuras labiais e/o palatinas. Por exemplo, a sinalização Wnt é essencial para a clivagem de CCN dentro das proeminências maxilares (Brugmann et al.,2007; Brugmann et al.,2006). Embriões com mutação de perda de função *Wnt9b* apresentam fissura labial e palatina, provavelmente devido à proliferação mesenquimal defeituosa levando ao crescimento insuficiente das proeminências orofaciais (Jin et al.,2012; Ji et al.,2020). A palatogênese depende do crescimento dos processos palatinos, que é conduzido principalmente por divisões celulares direcionadas e realocação organizada de CCN (Jones e Trainor,2005; Kaucka et al., 2016). Nesse caso, a apoptose excessiva de CCN pode impedir que as prateleiras palatinas entrem em contato com a linha média, levando a uma fissura palatina (Alappat et al.,2005; Dixon et al.,2006; Dudas et al.,2006; Jeong et al.,2006; Suwa et al.,2001; Wilson et al.,2016; Ji et al.,2020).

2.3 EPIGENETICA

Durante o desenvolvimento do organismo, processos celulares, como proliferação, diferenciação, adesão e migração, permitem o surgimento de formas e funções complexas a partir de um único conjunto de instruções: o genoma. Diferentes

estados e comportamentos celulares são amplamente ditados por padrões únicos de expressão gênica (Noonan & McCallion, 2010; Bulger e Groudine 2010; Rada-Iglesias et al., 2012). De fato, a cada momento de desenvolvimento e em cada tecido e órgão apenas os genes necessários são expressos de acordo com sua funcionalidade e o resto do genoma é silenciado (Jouve de la Barreda.,2020). As modificações estruturais em regiões do genoma, que afetam a expressão dos genes sem alterar a composição de bases do DNA, compreende os seguintes mecanismos epigenéticos:

- A metilação do DNA na regulação da expressão gênica em células eucarióticas consiste na adição de grupos metil ao carbono 5' em sítios de ligação à base de citosina em dinucleotídeos CpG no DNA. Em geral, no genoma de uma célula já diferenciada, encontramos um mosaico de regiões metiladas e não metiladas. Os primeiros sofrem condensação do DNA levando ao silenciamento dos genes neles incluídos, enquanto os não metilados são acessíveis a fatores de transcrição e enzimas, permanecendo em condições de expressão (Jouve de la Barreda,2020; Holliday & Pugh,1975; Riggs,1975; Jenuwein &Allis, 2001).
- Modificações epigenéticas de histonas; as histonas também podem receber radicais metil, e ter outras modificações, como acetilação, fosforilação e ubiquitinação. Todas essas modificações podem alterar a estrutura dos nucleossomos, contribuindo para uma maior ou menor compactação da cromatina. Foi descoberta a existência de um código de histonas, que ao modificar determinados aminoácidos contribui para tornar as regiões da cromatina mais frouxas ou condensadas, permitindo ou não o acesso dos fatores e cofatores necessários para a expressão gênica. Assim, a acetilação das histonas, H3 e H4, está associada à descondensação da cromatina e facilita a ativação do gene, a fosforilação da histona H3 produz o efeito oposto. A metilação das histonas ocorre em certos aminoácidos no terminal amino. Assim, quando a lisina e a arginina recebem um ou mais radicais metil, ocorre a compactação da fibra, enquanto a acetilação da lisina produz o efeito oposto. Todas essas alterações são reversíveis e enzimas como metiltransferases, acetiltransferases, demetilases, deacetilases etc, contribuem para isso. Em qualquer caso, as modificações de histonas não são estáveis e não são copiadas fielmente, podendo desaparecer após algumas gerações de células (Jouve de la Barreda,2020; Felsenfeld,2014).

- Outro tipo de modificações epigenéticas são aquelas determinadas pelo chamado RNA interferente –RNAi-, microRNA ou RNA não codificante –ncRNA-. São pequenas moléculas de RNA de aproximadamente 20 bases nucleotídicas que, direta ou organizados em complexos denominados RISC (RNA-induced silencing complex), são capazes de interferir na expressão de determinados genes ou regiões do genoma, podendo determinar a hipermetilação e condensação de regiões cromossômicas que se tornam heterocromatina. O papel relevante desse tipo de modificação epigenética é demonstrado pela existência de nada menos que 800 genes de RNA não codificante no genoma humano (Jouve de la Barreda,2020; Filipowicz,2005; Wassenegger,2005; Lee,2012).

Modificações epigenéticas não programadas também podem ocorrer sob a influência de fatores ambientais não controlados, o que pode levar a alterações na saúde (Jouve de la Barreda,2020).

Por muitos anos, a maioria dos esforços para entender o genoma humano se concentrou no estudo e anotação de sequências de codificação, pois isso poderia potencialmente descobrir a base genética da doença humana. No entanto, as sequências codificantes representam apenas cerca de 2% do genoma humano (Elgar et al., 2008; Sanchez et al.,2020). Muitas das sequências restantes que são as sequências não codificantes estão envolvidas na regulação genética (ENCODE Project Consortium,2012). E a importância das sequências reguladoras não codificantes é bem ilustrada pelo fato de que até 90% das variantes associadas à doença residem em sequências não codificantes preferencialmente dentro de *enhancers* putativos (Maurano et al.,2012; Krijger & De Laat,2016). É provável que grande parte da variação genética subjacente a distúrbios complexos como fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômica ocorram em elementos reguladores fora das sequências de codificação dos genes (Dixon et al.,2011).

A expressão genética depende de sequências regulatórias que atuam em cis (no mesmo cromossomo) e respondem a diferentes fatores (classicamente, fatores de transcrição e RNAs longos não codificantes) que são codificados por genes que atuam em trans (em diferentes cromossomos) (Savarese & Grosschedl,2006).

Os tipos mais relevantes de sequências reguladoras cis não codificantes incluem promoters, enhancers, silencers e insulators (Ong & Corces,2011; Wittkopp & Kalay, 2012).

- Os promoters são ligados por um conjunto central de reguladores transcricionais amplamente utilizados e altamente conservados (por exemplo, RNA polimerase II, fatores gerais de transcrição ou GTFs etc.) que conferem atividade transcricional basal e permitem a iniciação da transcrição (Brown & Feder,2005).
- Os enhancers controlam positivamente a expressão de seus genes alvo no tempo e no espaço (Wray,2007) e são os principais determinantes dos programas de expressão genética específicos do tipo de célula (Bulger & Groudine,2011; Buecker & Wysocka,2012).
- Os silencers e insulators também contribuem para o estabelecimento de programas específicos de expressão gênica, reprimindo genes ou bloqueando enhancers, respectivamente (Gaszner & Felsenfeld, 2006; Doni Jayavelu et al., 2020; Ngan et al., 2020; Pang & Snyder,2020).

2.3.1 ENHANCERS

Os enhancers (sequências de DNA de aprox. 200-500 bp) desempenham um papel importante na especificação da regulação gênica espaço-temporal durante a embriogênese. A característica definidora dos enhancers é sua capacidade de conduzir a expressão gênica à distância, independentemente de sua orientação em relação ao local de início da transcrição (Bulger & Groudine,2010; Ong & Corces,2011; Williamson et al., 2011; Buecker, & Wysocka,2012). A modularidade dos enhancers, seu desacoplamento dos promotores e posicionamento longe dos locais de início da transcrição, permite que um determinado gene seja transcrito em vários tecidos, em níveis variados, em resposta a cascatas de sinalização distintas e em diferentes estágios durante o desenvolvimento através da utilização de diferentes módulos de enhancers especializados (Uchikawa et al.,2003; Granier et al.,2011; Buecker, & Wysocka,2012).

Porém, os enhancers transcricionais são o principal determinante da expressão gênica específica do tipo de célula (Buecker & Wysocka, 2012; Bulger & Groudine, 2010, 2011). Uma característica central dos enhancers é sua capacidade de funcionar

como padrões (motifs) integradas de ligação ao TF (fatores de transcrição), reconhecidas tanto pelos principais especificadores de linhagem quanto pelos efetores de ligação ao DNA das vias de sinalização (Buecker & Wysocka, 2012; Mullen et al., 2011; Trompouki et al., 2011). Estudos recentes mostraram que o perfil epigenômico de características de cromatina comumente associadas aos enhancers, incluindo a ocupação de coativadores transcricionais gerais como p300, hipersensibilidade a nucleases e enriquecimento de certas marcas de histonas em nucleossomos flanqueadores como: H3K27ac, H3K4me1, H3K4me3 y H3K27me3, permite a identificação de enhancers em um genoma, tipo celular específico e maneira independente de conservação. A marca de histona H3K27ac tem um papel importante porque distingue enhancers ativos de elementos enhancers inativos/equilibrados durante o desenvolvimento (Heintzman et al., 2009; Rada-Iglesias et al., 2011, 2012; Visel et al., 2009; Creighton et al., 2010).

2.3.1.1 IDENTIFICAÇÃO DE ENHANCERS

Durante os últimos 10 anos, uma variedade de métodos "pós-genoma" foram desenvolvidos para a identificação sistemática de enhancers (que podem existir tanto a 5' quanto a 3' do gene ou dentro da unidade de transcrição). Ensaios transgênicos são necessários para confirmar suas identidades (Lagha et al., 2012). Alguns métodos são:

- **Métodos computacionais:** Os enhancers geralmente contêm uma alta densidade de sítios de ligação de fatores de transcrição, normalmente um para cada 30-50 pb ao longo do enhancers (200-300 pb ou mais). Algoritmos foram desenvolvidos para identificar clusters de alta densidade de sítios de ligação putativos (Berman et al., 2002; Markstein et al., 2002) Esses métodos funcionam, mas normalmente apenas 10% a 30% dos "acertos" representam verdadeiros enhancers quando testados em embriões transgênicos (Lagha et al., 2012).
- **ChIP-Seq:** Permite a identificação de sítios de ligação para fatores de transcrição específicos de sequência ou modificações de histonas em todo o genoma (Liang et al., 2008; Nien et al., 2011). ChIP-Seq usa anticorpos para a identificação de enhancers (Zeitlinger et al., 2007). É possível identificar enhancers ativos de todo o genoma para um determinado tecido, identificando

modificações de histonas particulares, ou as enzimas responsáveis por essas modificações (May et al.,2011; Lagha et al.,2012).

- **Ensaio de captura de conformação cromossômica (3C):** Podem identificar as sequências em um genoma que interagem com promotores específicos. Baseia-se na estabilização de "loops" transitórios de enhancers distais para promotores alvo através de cross-linking de formaldeído, semelhante ao cross-linking de cromatina usada para ensaios ChIP-Seq. Métodos 4C (captura de conformação cromossômica no chip) foram usados para identificar enhancers múltiplos e sobrepostos. Os ensaios 3C e 4C fornecem uma estimativa das interações gerais que ocorrem in vivo, mas não revelam a dinâmica dessas interações de longo alcance (Montavon et al., 2011; Lagha et al.,2012).
- **ATAC-Seq:** Identifica regiões de DNA acessível sondando a cromatina aberta com a transposase Tn5 que cliva e marca o DNA com adaptadores de sequenciamento (Rickels et al.,2018).

Numerosos estudos genômicos concordam que a grande maioria das variações associadas a doenças ocorrem dentro de sequências genômicas não codificantes (Rickels et al.,2018; Bulger et al.,2011; Benerji et al.,1983). O distúrbio de enhancers pode levar à doença humana através de dois mecanismos principais

- Mutações ou variantes de número de cópias podem alterar diretamente as sequências de enhancers e, assim, afetar a expressão de seus genes alvo (Sanchez et al.,2020).
- Variantes estruturais podem provocar mudanças na organização da cromatina 3-D que não alteram nem os enhancers nem seus genes alvos, mas sim a comunicação física entre eles (Sanchez et al.,2020).

2.4 POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP)

É uma variação na sequência de DNA que afeta uma única base (adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G)) de uma sequência de genoma. No entanto, geralmente considera-se que alterações de alguns nucleotídeos, assim como pequenas inserções e deleções (indels) podem ser consideradas como SNPs. Uma dessas variações deve ocorrer em pelo menos 1% da população para ser considerada

como SNP. Se 1% não for alcançado, não é considerado um SNP, mas sim uma mutação pontual (Sherry et al., 2001).

SNPs são marcadores importantes em muitos estudos que ligam variações de sequência a alterações fenotípicas e também estão associados a várias doenças e características complexas relacionadas a doenças (Zhu & Zhou, 2020; Kim & Misra, 2007).

A identificação de SNPs em enhancers pode ter implicações para o tratamento de doenças, mesmo quando um SNP não causa doença. Porém novas mutações de sequências enhancers e dos fatores proteicos que regulam a função enhancer na doença humana continuam a ser identificadas, contribuindo para uma classe crescente de “melhorias” (Smith & Shilatifard, 2014).

3 PROPOSIÇÃO

Sabe-se que as fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas são deformidades congênitas comuns com etiologia multifatorial; diversas mutações no genoma causam defeitos na expressão de genes durante o desenvolvimento ou fusão dos processos faciais na embriogênese, provocando esse tipo de alterações que acarretam problemas de alimentação, fala, infecções do ouvido e defeitos dentais, tendo como resultado uma repercussão na qualidade de vida do indivíduo. Estas alterações têm sido objeto de estudos, mas pouco se conhece de variantes genéticas como SNPs em enhancers de células da crista neural humana relacionados a estas doenças.

Sendo assim, o objetivo geral do estudo foi avaliar as variantes genéticas associadas a fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas em *enhancers* de células da crista neural humana.

Os objetivos específicos do estudo foram:

- Fazer uma anotação das variantes genéticas humanas que já foram correlacionadas com NSCLP disponíveis na literatura.
- Verificar quais variantes associadas a NSCLP estão inseridas em enhancers de células da crista neural humana.
- Verificar se as variantes associadas a NSCLP inseridas em enhancers, estão próximas a genes envolvidos com o desenvolvimento craniofacial.
- Verificar quais variantes associadas a NSCLP tem atividade enhancer in vivo já estudada por meio do banco de dados **VISTA ENHANCER BROWSER**.
- Verificar a afinidade das variantes associadas a NSCLP inseridas em enhancers para ligação de FT.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho de estudo

Trata-se de um estudo qualitativo, analítico, retrospectivo, que avaliou a localização de variantes genéticas associadas a fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas em *enhancers* de células da crista neural humana.

Coleta de dados

Para a coleta das variantes genéticas associadas a NSCLP usou-se as seguintes plataformas:

- **CATALOGO GWAS:** é um banco de dados online gratuito que coleta dados de estudos de associação do genoma todo (GWAS), resumindo dados não estruturados de diferentes fontes bibliográficas em dados acessíveis de alta qualidade inclui 5273 publicações e 276696 associações. A busca das variantes no catálogo GWAS iniciou-se no dia 12 de agosto de 2020 até o dia 02 de setembro de 2020 com as palavras-chave: cleft lip, cleft palate e oral cleft.
- **PUBMED:** é um site de busca gratuito que acessa principalmente o banco de dados MEDLINE de referências e resumos em ciências biológicas e tópicos biomédicos.
 - **Critério de inclusão:** Todos os estudos de fissuras palatinas e/ou labiais não sindrômicas feitos em humanos sem limite de data de publicação.
 - **Crítérios de exclusão:** revisões e metánaleses

A busca de artigos iniciou-se no dia 17 de setembro de 2020 até o dia 14 outubro de 2020 com as palavras-chave: cleft lip gene, cleft lip genetic variant, cleft lip genetic, cleft lip mutation, cleft lip single nucleotide polymorphism, cleft lip snp, cleft palate gene, cleft palate genetic variant, cleft palate genetic, cleft palate mutation, cleft palate single nucleotide polymorphism, cleft palate snp.

- **DISGENET:** é um banco online gratuito de dados para a exploração dinâmica de doenças humanas e seus genes. A busca das variantes iniciou-se o dia 23 de outubro de 2020 até 03 de novembro de 2020 com as palavras chave: Cleft palate, Cleft palate with cleft lip, Bilateral cleft lip, Unilateral cleft lip, Cleft Lip with or without Cleft Palate, Cleft palate and bilateral cleft lip, Cleft lip isolated, Cleft palate isolated, cleft palate, x-linked, Median cleft lip, Nonsyndromic cleft

lip with or without cleft palate, Bilateral cleft palate, Unilateral cleft palate, Cleft lip or lips, Submucous cleft palate.

Usou-se outros sites para análises:

- **ENSEMBL e UCSC GENOME BROWSER HOME:** São navegadores de genoma para genomas de vertebrados que oferecem suporte à pesquisa em genômica comparativa, evolução, variação de sequência e regulação da transcrição. Anotam genes, calcula alinhamentos múltiplos, prediz a função regulatória e coleta dados de doenças.
- **NCBI:** O National Center for Biotechnology Information faz parte da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos, é uma importante fonte de informações de biotecnologia e biomedicina e é um recurso importante para ferramentas e serviços de bioinformática.

Todas as variantes coletadas foram inseridas nesses sites para conhecer o “tipo de variante” e mudar as variantes que inicialmente estiveram no GRCh38 para o GRCh37.

- **VISTA ENHANCER BROWSER:** É um banco de dados de análise comparativa para identificar enhancer candidatos no genoma humano, juntamente com a determinação experimental de sua atividade enhancer in vivo em camundongos transgênicos. Nesse site foram inseridas as posições genômicas das variantes associadas a NSCLP para sua avaliação.
- **STAMP** (www.benoslab.pitt.edu): É uma plataforma virtual gratuita fornecida pelo Laboratório Benos/ Biologia computacional e de Sistemas da Universidade de Pittsburgh, usado para o estudo de motivos e afinidade de fatores de transcrição. As variantes que tiveram atividade nas marcas de histona para enhancer de células da Crista Neural foram avaliadas no STAMP onde foi inserido o motivo (sequências de 8 a 10 nucleotídeos com e sem o SNP) para prever a afinidade de fatores de transcrição.
- **Instrumento 1:** A coleta de variantes foi numa tabela que contém:
 - Gene mapeado
 - SNP
 - Alelo
 - Valor “p “

- Tipo de fissura (fissura labial e/ou labiopalatina, fissura palatina)
- ID PubMed
- Localização da variante
- Região citogénica da variante
- Amostra
- Tipo de variante
- Plataforma (GWAS, PUBMED, DISGENET)

A tabela foi realizada no Microsoft Excel (2019) e foram removidas as variantes duplicadas para selecionar as variantes únicas. **(Anexo 1)**

Análise de dados

Para identificar os enhancers no genoma, inicialmente identificou-se regiões cis-reguladoras candidatas pela presença de enriquecimento para Fatores de Transcrição (TF), enriquecimento de marcas de histona como H3K4me1, H3K4me3, coativador p300, e principalmente a marca de histona H3K27ac e ATAC-seq (Heintzman et al., 2007) (Creyghton et al., 2010, Rada-Iglesias et al., 2011) (Prescott et al., 2015); para isso, as variantes genéticas associadas a fissuras palatinas e/ou labiais não sindrômicas coletadas no instrumento 1, foram inseridas uma a uma no **UCSC GENOME BROWSER HOME** (<http://genome.ucsc.edu/>) onde foram inseridos dados de sequenciamento de imunoprecipitação da cromatina (ChIP-seq de histona para H3K4me3, H3K27ac, H3K4me1, P300) e o ensaio para cromatina acessível por transposase (ATAC-seq) usando os conjuntos de dados de sequenciamento depositados por Prescott et al., 2015 e Long et al., 2020), também foram ativadas as pistas das sequencias motifs para FT já identificados em diferentes linhagens celulares por meio de CHIP-seq : Transcription Factor CHIP-seq Peaks (338 factors in 130 cell types) from ENCODE 3, Transcription Factor ChIP-seq Uniform Peaks from ENCODE/Analysis, HMR Conserved Transcription Factor Building Sites.

Instrumento2: Os resultados da análise dessas variantes foram coletados numa tabela que contem:

- SNP
- PMID

- Nome do site
- Marcas de histona para enhancer de células da Crista Neural (H3K4Me3, H3K27ac, P300, H3K4me1, ATAC-seq)
- Marcação de motifs para ligação de TF
- Tipo de variante
- Gene mapeado

A tabela foi realizada no Microsoft Excel 2019. **(Anexo 2)**

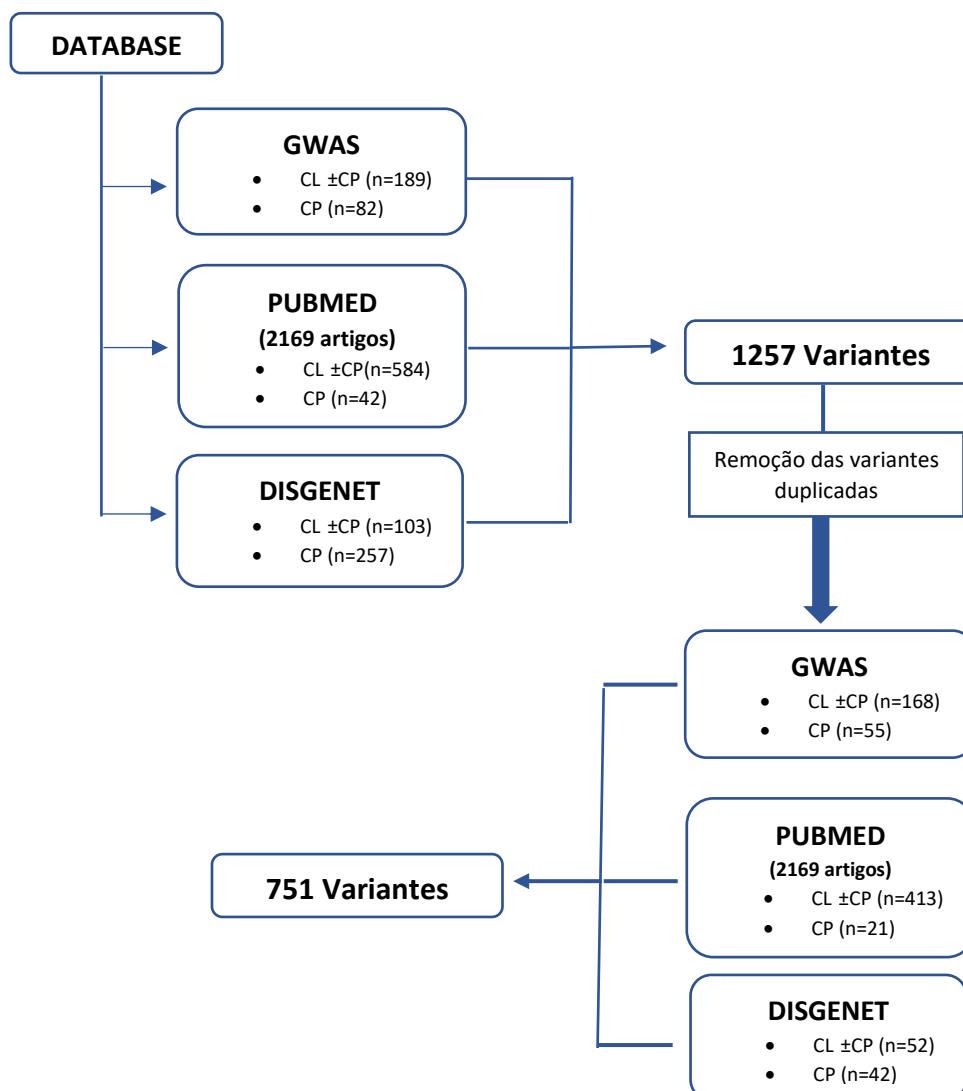
Análise estatística

A estatística descritiva - exploratória consistiu em porcentagens e contagens feitas no Microsoft Excel 2019 e RStudio 3.6.1.

5 RESULTADOS

No total foram coletadas 1257 variantes genéticas associadas a fissuras palatinas e/ou labiais não sindrômicas do Catálogo GWAS, PUBMED e DISGENET. No catálogo GWAS se coletaram 271 variantes, no PUBMED se avaliaram 2169 artigos e foram coletadas 626 variantes, sendo o número maior nestas duas plataformas, as variantes associadas a fissuras labiais com ou sem fissuras palatinas. No DISGENET se coletaram 360 variantes sendo o número maior, as variantes associadas a fissuras palatinas. Durante o processo de coleta foram removidas as variantes duplicadas, resultando em 751 variantes únicas (Anexo 1), sendo o número maior, as variantes associadas a fissuras labiais com ou sem fissuras palatinas (fluxograma)

FLUXOGRAMA:



CL ±CP: Fissura labial com ou sem fissura palatina, CP: Fissura palatina

Análise de dados

As 751 variantes associadas a NSCLP (Anexo 2) foram avaliadas, sendo as variantes em regiões regulatórias: Intrônicas e Intergênicas as mais frequentes (Figura 1)

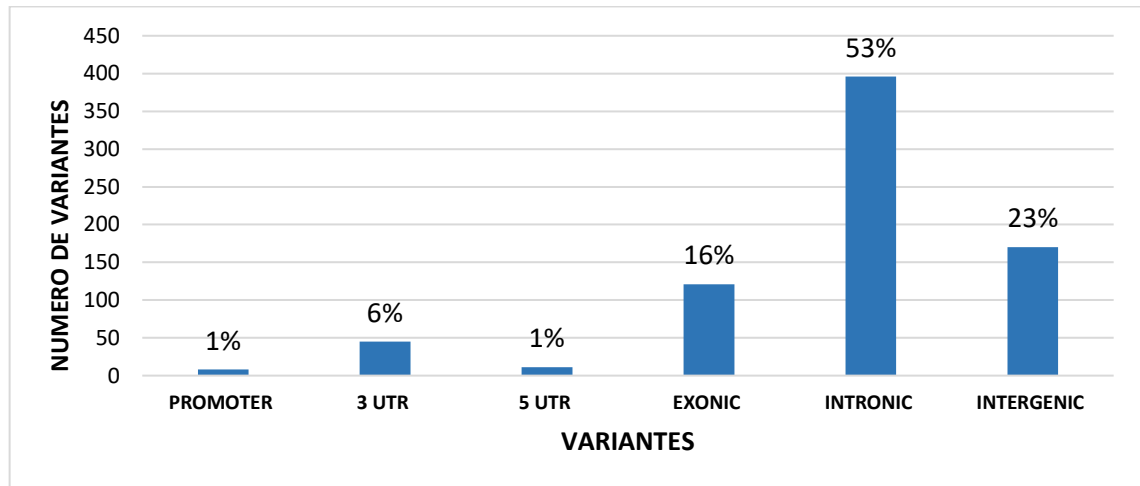


Figura 1- Distribuição da localização das variantes genéticas associadas a NSCLP em diferentes regiões do genoma

Das 751 variantes associadas a fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas, somente um 11% das variantes tiveram algum tipo de marcação nos dados de ChIP-seq de histona e ATAC-seq, relacionadas à atividade para enhancers, em células da Crista Neural Humana, 16% estão em sequencias motifs para FT já identificados em diferentes linhagens celulares por meio de ChIP-seq. (Figura 2) Sendo o maior número de variantes localizadas na sequência motif: GM12878 POLR2A. (Figura 3)

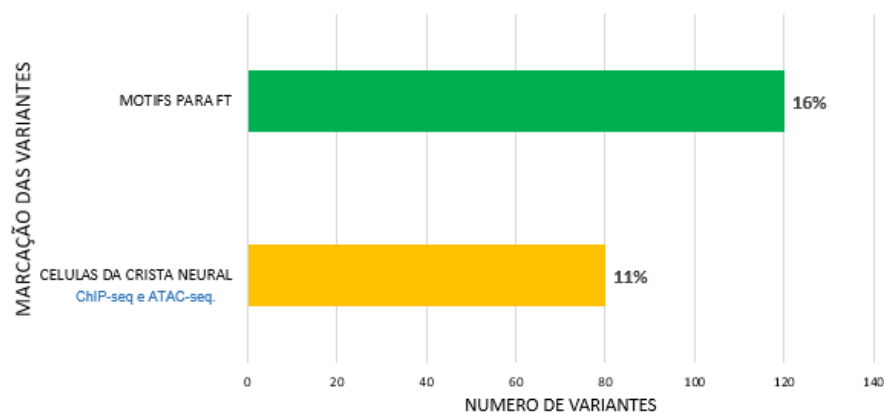


Figura 2- Distribuição das variantes genéticas associadas a NSCLP segundo a marcação nos motifs para FT e marcações nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq, para enhancer em células da crista neural humana.

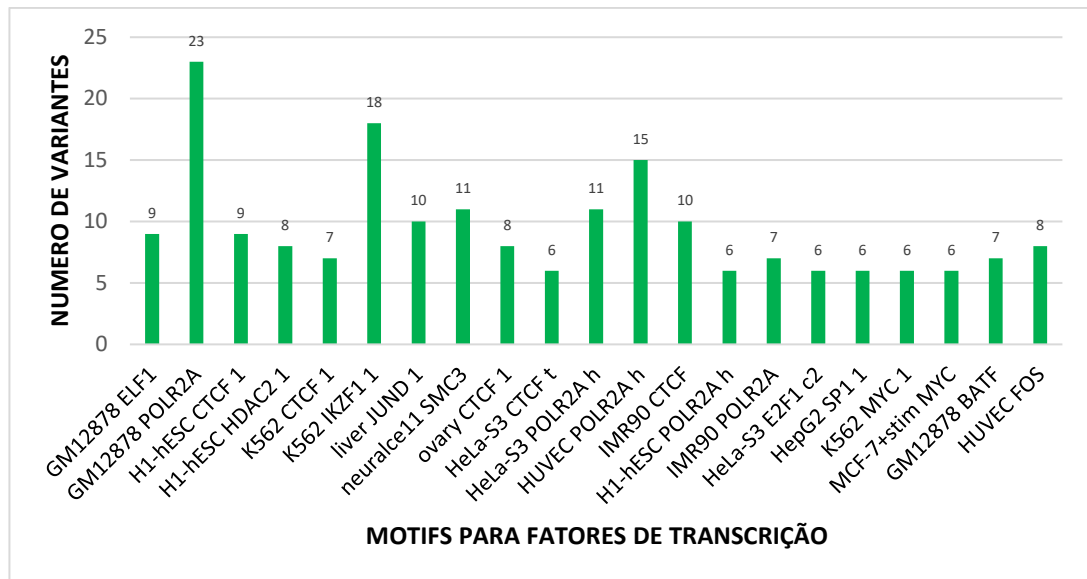


Figura 3- Distribuição das variantes genéticas associadas a NSCLP que se encontram em sequências motifs para FT.

11% do total das variantes associadas a fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas, as quais tiveram alguma marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural (Anexo 3), foram separadamente avaliadas sendo as variantes Intrônicas as mais frequentes. (Figura 4)

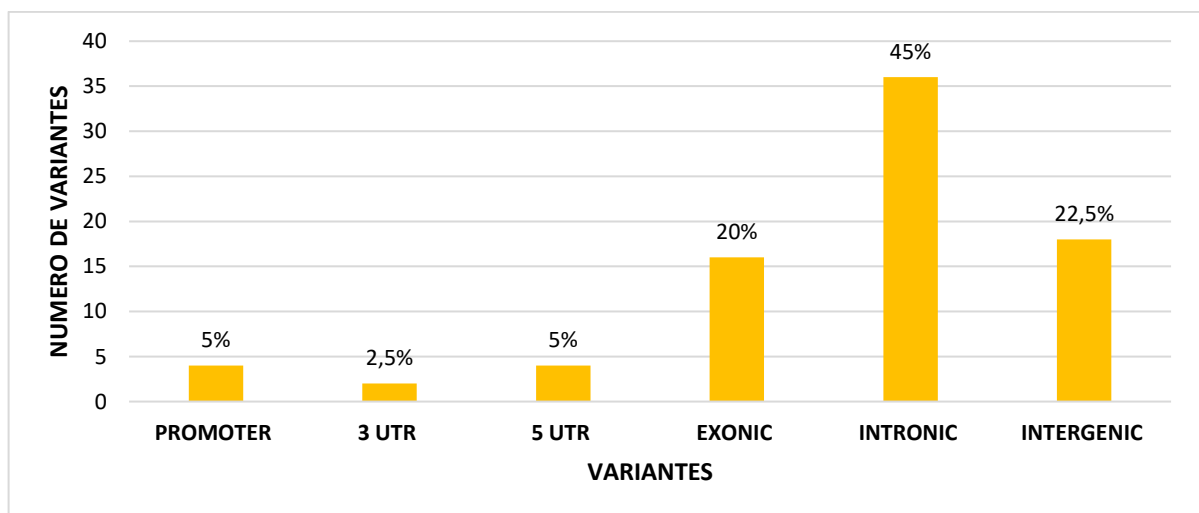


Figura 4- Distribuição da localização das variantes que tiveram alguma marcação nos dados de ChIP-seq e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural.

Se identificam regiões cis-reguladoras candidatas para enhancer no genoma pela marcação nos motifs para FT e marcações nos dados de ChIP-seq de histonas

(H3K4me1, H3K4me3, p300, H3K27ac) e ATAC-seq (Acessibilidade da cromatina), considerando as mais importantes as marcas de H3K27ac e ATAC-seq (Heintzman et al., 2007; Creighton et al., 2010; Rada-Iglesias et al., 2011; Prescott et al., 2015). Na avaliação das variantes que tiveram marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural do estudo focado no enriquecimento de TF, 36% estiveram em sequências motifs para TF (figura 5.A). Sendo o maior número de variantes localizadas na sequência motif: GM12878 POLR2A (Figura 5.B).

Na avaliação das variantes com marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural, as marcações mais frequentes de forma geral foram para: H3K27ac, H3K4me1, H3K4me3 (figura 6). Na avaliação segundo as regiões de localização das variantes, as variantes Intrônicas mais frequentes tiveram as marcas: H3K27ac, H3K4me1, H3K4me3 (figura 7).

Na avaliação de sobreposição das marcações das variantes avaliadas; as sobreposições de marcas mais frequentes foram: H3K27ac - H3K4me1 em 8 variantes, H3K4me3 - H3K4me1 em 5 variantes, H3K27ac - H3K4me3 em 5 variantes, H3K27ac - H3K4me1 - H3K4me3 em 5 variantes e H3K27ac - H3K4me3 - P300 - ATAC-seq em 4 variantes (figura 8).

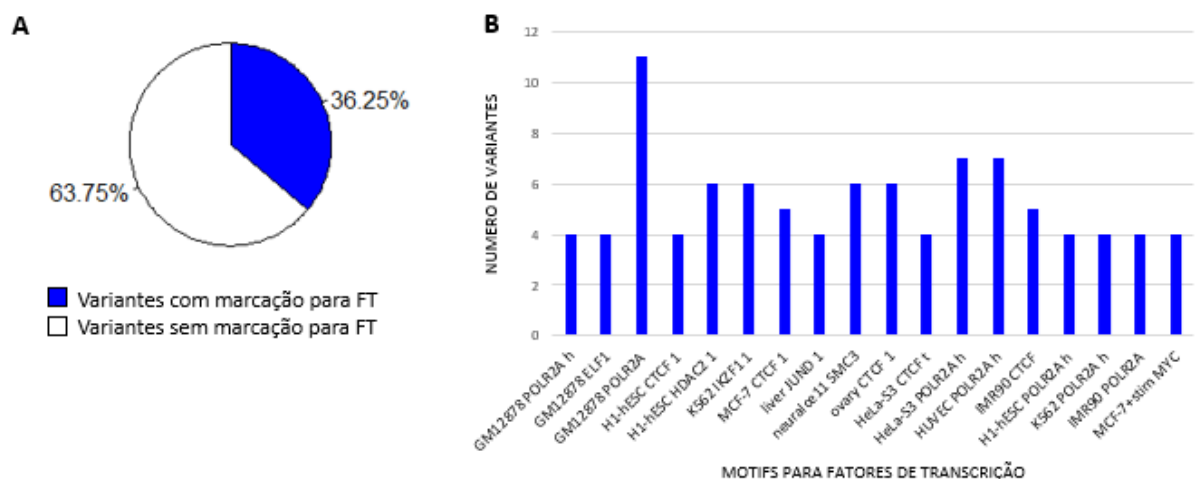


Figura 5- Distribuição da marcação para FT das variantes que tiveram alguma marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural A) Porcentagem das variantes que tiveram marcação para FT. B) Variantes que se encontram em sequências motifs para FT.

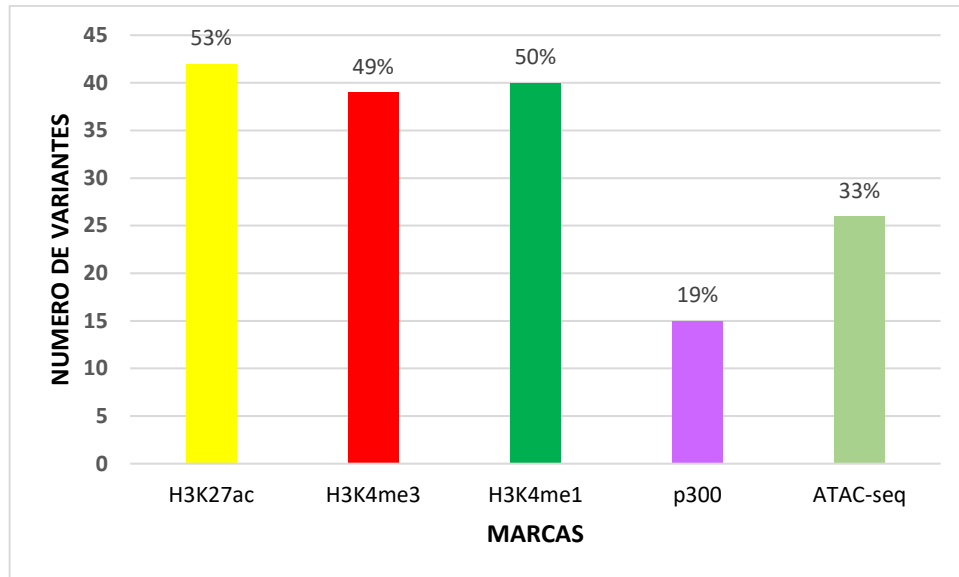


Figura 6- Distribuição das variantes segundo as marcações nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural.

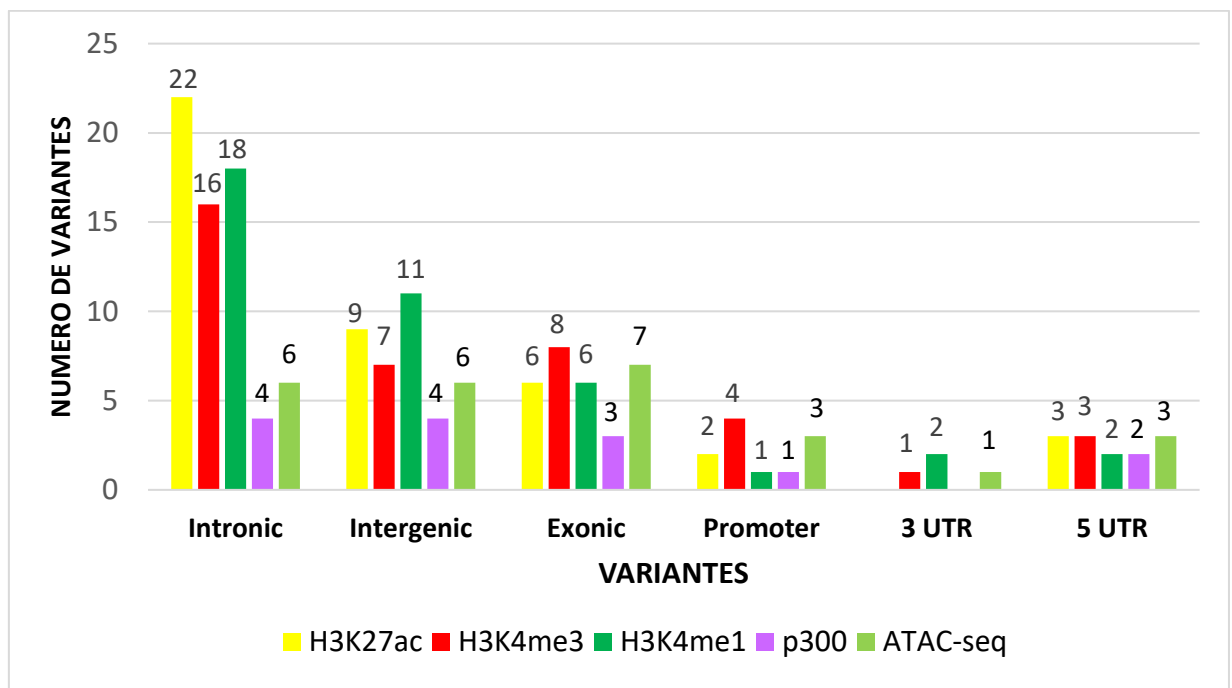


Figura 7- Distribuição de número de variantes com marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural segundo as suas regiões de localização.

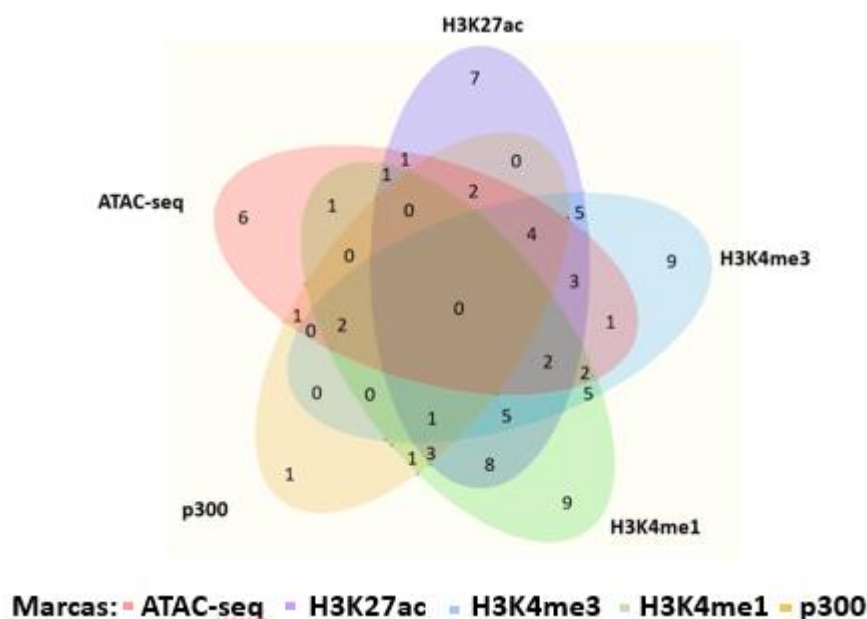


Figura 8- Gráfico de Venn, número de sobreposições das marcações das variantes que tiveram marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural.

Na avaliação dos genes, ou proximidade com estes, que tiveram a maior frequência de variantes com marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural, os genes TFAP2A, MSX1, PAX7, AXIN2, BMP4, SUMO1 e IRF6 tiveram o maior número de variantes, os outros genes como SOX9, THADA, WNT3, que tiveram só uma variante no nosso estudo, estão no grupo de “Outros genes” (figura 9).

Quando foi avaliada a localização específica das variantes; o gene TFAP2A foi o que apresentou o número maior de variantes com 9 no total; 6 variantes intrônicas (rs537112, rs533558, rs303048, rs1675414, rs3798693, rs303050), 2 exônicas (rs121909574, rs758551492) e 1 variante intergenica (rs151137431). O gene MSX1 teve 5 variantes; 3 intergenicas (rs6446693, rs1907998, rs3821949), 1 intrônica (rs3775261) e 1 variante exônica (rs761710147), o gene PAX7 teve 4 variantes; as 4 foram intrônicas (rs6659735, rs36068947, rs4920338, rs9439714), o gene AXIN2 teve 4 variantes; 3 intrônicas (rs3923086, rs7210356, rs7224837) e 1 exônica (rs2240307), o gene BMP4 teve 4 variantes; 1 intrônica (rs762642), 2 intergenicas (rs2738265, rs2855530) e 1 variante 3UTR (rs2071047), o gene SUMO teve 2 variantes intrônicas (rs6761234, rs6761131), o gene IRF6 teve 2 variantes; 1 intergenica (rs2064163) e 1 variante promotora (rs7545538), o grupo “Outros genes” tiveram só 1 variante e geralmente foram intrônicas.

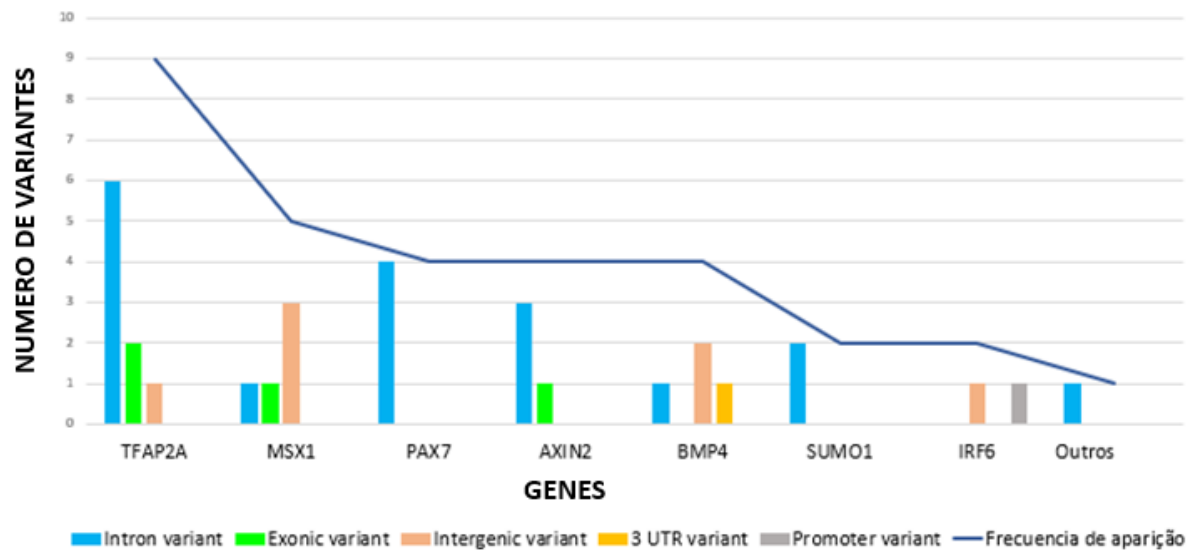


Figura 9- Número das variantes nos genes, ou próximo a eles, mapeados das variantes que tiveram marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq para enhancer de células da Crista Neural.

As 751 variantes associadas a NSCLP foram inseridas no banco de dados **VISTA ENHANCER BROWSER** para sua avaliação, percebemos que 24 delas se encontram em regiões as quais já foram testadas para avaliar se possuem atividade de enhancer in vivo por meio da geração de camundongos transgênicos. Das 24 variantes, 11 delas estavam inseridas em regiões que exibiram atividade de enhancer in vivo, e 13 não exibiram nenhuma atividade. Das 11 variantes que exibiram atividade in vivo, 2 foram detectadas na região craniofacial. (figura 10)

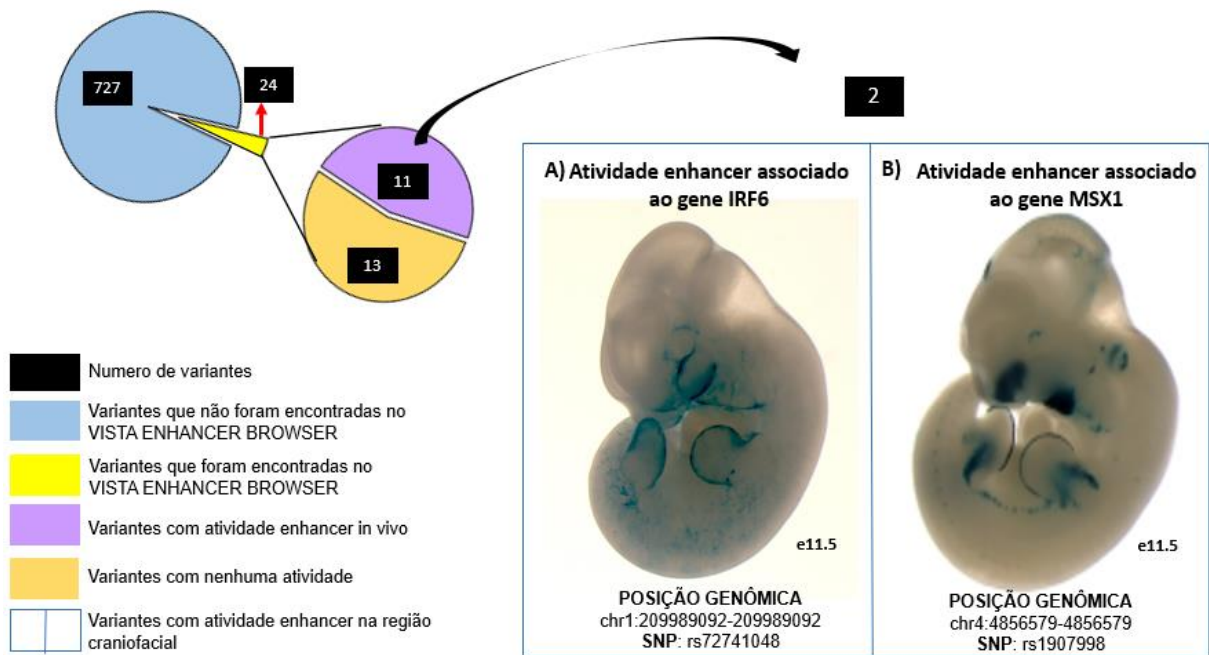


Figura 10- Distribuição do total das variantes associadas a NSCLP avaliadas no banco de dados VISTA ENHANCER BROWSER. A) Expressão da atividade enhancer no membro superior e inferior arco branquial, olho, nariz. B) Expressão da atividade enhancer no romboencéfalo, somito, mesencéfalo, membro superior e inferior, arco branquial, olho, nariz, tubérculo genital, mesênquima facial, orelha.

Os motifs com as variantes que tiveram marcação nos dados de ChIP-seq de histonas e ATAC-seq, para enhancer de células da Crista Neural foram avaliadas no STAMP e observou-se que os motifs que tiveram inseridos os SNPs modificam a afinidade do fator de transcrição. (Figura 11)

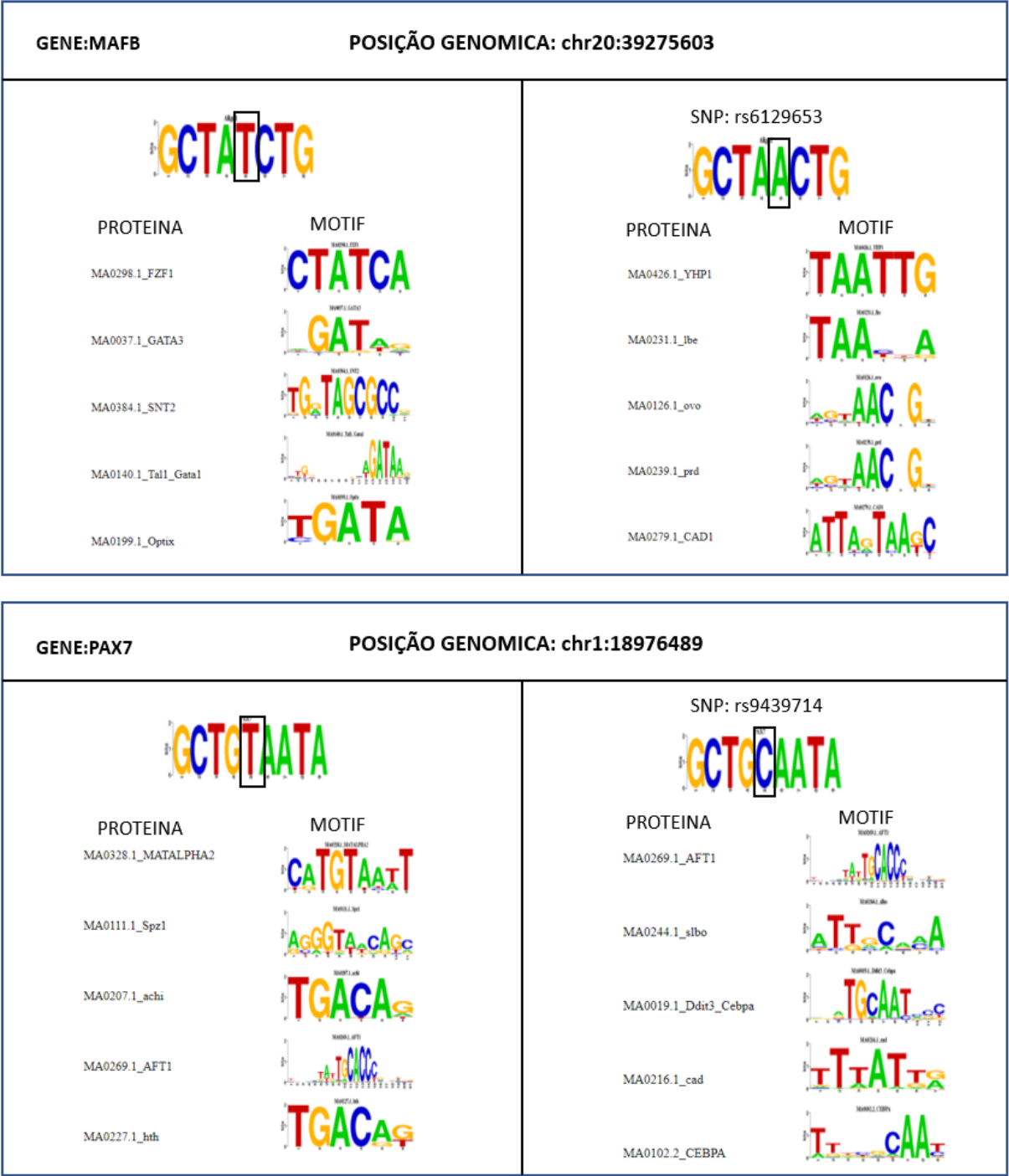


Figura 11- Avaliação dos motifs com as variantes associadas a NSCLP que tiveram marcação nos dados de ChIP-seq de histona e ATAC-seq para enhancers de células da Crista Neural no STAMP.

6 DISCUSSÃO

De acordo com Dixon et al., 2011; Marazita et al., 2016. Os modelos animais e dados de expressão gênica são ferramentas poderosas para identificar genes candidatos para características complexas e novos estudos GWAS aumentam o número de loci identificados, corroborando os achados nesse estudo, a coleta de variantes associadas a NSCLP além do GWAS também foi do PUBMED e DISGENET e embora as variantes coletadas do DISGENET foram preferentemente variantes associadas a CP, na coleta geral o número das variantes associadas a CL $\pm$ CP foi maior do que o número das variantes de CP isoladas, o que também poderia estar relacionado com a presença maior de CL $\pm$ CP do que CP isoladas em pacientes.

Nos estudos de Franke et al., 2016; Laugsch et al., 2019; Lupiáñez et al., 2015; as mutações como deleções e duplicações em regiões não codificantes têm o potencial de alterar a integridade do genoma, causando mudanças na arquitetura regulatória que levam a alterações patogênicas nos níveis e padrões de expressão gênica. Porém, essas variantes estão cada vez mais implicadas em doenças humanas, o que concorda com os dados desse estudo com a maior presença de variantes associadas a NSCLP em regiões não codificantes.

Nos estudos de Pan et al., 2022; tem coletado amostras de pacientes com NSCLP desde o ano 2008 e estabeleceram um biobanco, descobriram vários loci relacionados com NSCLP, realizaram estudos funcionais sobre loci y genes mediante o uso de biologia molecular, biologia celular, modelos animais e outros métodos para fornecer uma base para a construção do mapa genético NSCLP na população chinesa, tais variantes estão localizadas em regiões intrônicas e intergênicas, dados que concordam com os achados nesse estudo com a presença do maior número de variantes coletadas associadas a NSCLP localizadas em regiões intrônicas e intergênicas.

Nos estudos de Spitz, 2016 e Long et al., 2020, as mutações não codificantes em elementos cis-reguladores que causam redução sutil da expressão do gene pode

levar a alterações na morfologia craniofacial pela capacidade reduzida no desenvolvimento das estruturas. o que corrobora com os achados nesse estudo com a presença de variantes associadas a NSCLP com marcação para FT e marcas de histonas para enhancer de células da Crista Neural o que pode levar a alterações no desenvolvimento craniofacial com a presença de NSCLP

No estudo de Julia Welzenbach J et, al.,2021 as mutações não codificantes em elementos cis-reguladores acrescenta o risco da presença de NSCLP nas pessoas, concordando com os resultados este estudo mostram a presença de variantes associadas a NSCLP com marcação para FT e marcas de histonas para enhancer de células da Crista Neural.

Segundo o estudo de Rada-Iglesias et al., 2013; os *enhancers* que atuam nas Celulas da Crista Neural e seus derivados durante o desenvolvimento embrionário são os principais responsáveis da diversidade fenotípica facial o que concorda com nosso estudo pela presença de variantes associadas a NSCLP com marcação para FT e marcas de histonas para enhancer de células da Crista Neural.

De acordo com o estudo de White et al.,2021; onde identificaram variantes significativas associados à variação facial de intervalo normal e descobriram que as regiões ao redor dessas variantes são enriquecidas para atividade *enhancer* nas células da crista neural craniana e tecidos craniofaciais e várias regiões abrigam múltiplos variantes com associações a diferentes fenótipos faciais e há evidências de possíveis ações coordenadas de variantes, dados que corroboram os resultados desse estudo pela presença de variantes associadas a NSCLP com marcação para FT e marcas de histonas para enhancer de células da Crista Neural.

No estudo de Liu et al.,2020; onde predisseram os efeitos de 14 variantes associadas a fissuras orofacial não sindrômica de estudos GWAS e identificaram uma variante numa região enhancer que regula a expressão do gene KRT8 em células epiteliais orais humanas. O gene KRT18 é expresso em muitos epitélios além da

periderme como o ectoderma da superfície embrionária. Porém, esses dados confirmam que variantes nos enhancer que atuam nas células da Crista neural podem desencadear má-formação na face contribuindo a presença de NSCLP que foi o objetivo principal do presente estudo.

De acordo com o estudo de Lin et al,2019, variantes associados com NSCLP já estudadas estavam localizadas numa região enhancer que regula a expressão do gene p63, usando o modelo de transdiferenciação induzível combinada com sequenciamento epigenômico e meta-análise de várias coortes de dados de estudos de associação de todo o genoma, mostraram que tais variantes eliminam a função do enhancer, causando a expressão deficiente de p63 gene importante no desenvolvimento craniofacial humano, mostrando o vínculo molecular forte entre a função enhancer de p63 e NSCLP, o que concorda com esse estudo pela presença de variantes associadas a NSCLP que tiveram marcação para FT e marcas de histonas para enhancer de células da Crista Neural, porém tais variantes podem eliminar a função do enhancer e causar a expressão deficiente de genes associados ao desenvolvimento craniofacial sugerindo a presença de NSCLP.

Segundo os estudos de Heintzman et al., 2007,2009; Creyghton et al.,2010; a identificação dos enhancers se caracteriza pelo enriquecimento de certas marcas de histonas como H3K27ac, H3K4me1, H3K4me3 e o coativador p300. Considerando a marca de histona H3K27ac a mais importante porque distingue enhancers ativos de enhancers inativos/equilibrados; dados que concordam com nosso estudo pela presença de variantes associadas a fissuras labiais e/ou palatinas que tiveram marcações nas histonas já ditas, considerando que a maioria das variantes tiveram marcação nas histonas: H3K27ac, H3K4me1, H3K4me3.

De acordo os estudos de Dixon et al.,2011; Marazita et al., 2016. o número de loci identificados e a forte evidência estatística vem de variantes em um "deserto de genes" sem regiões codificantes reconhecidas nas proximidades,e é particularmente intrigante que modelos de camundongos tenham sugerido que essa região pode

conter uma região reguladora crítica para o desenvolvimento craniofacial normal, dado confirmado nesse estudo pela presença de variantes associadas a NSCLP nas regiões intergenicas próximas a genes importantes no desenvolvimento craniofacial e que tiveram marcação para FT e marcas de histonas para enhancer de células da Crista Neural, além que algumas de tais variantes mostraram atividade de enhancer in vivo na região craniofacial por meio da geração de camundongos transgênicos vistas no VISTA ENHANCER BROWSER.

Segundo o estudo de Buecker & Wysocka,2012; Rao et al.,2021; os enhancers tem a capacidade de funcionar como motifs que recrutam fatores de transcrição (FTs) para ativação de genes. Consequentemente, os enhancers geralmente contêm sítios de reconhecimento agrupados para múltiplos FTs que representam classes distintas de proteínas de ligação ao DNA. Dado que se confirmou nesse estudo, a maioria das variantes associadas a NSCLP que tiveram enriquecimento nas marcas de histona para enhancer também tiveram múltiplos marcações para FT.

No estudo de Dixon et al.,2011; Marazita & Leslie,2013; Deshpande & Goudy,2018; destacam os genes e loci genéticos em IRF6, MAFB, VAX1, BMP no desenvolvimento de NSCLP, durante a nossa análise, foi possível observar que variantes já associadas a NSCLP estavam localizadas próxima a genes já classicamente definidos como importantes na patogênese de NSCLP. No entanto, outras variantes intergênicas foram identificadas como estarem em enhancers preditos como sendo de genes que ainda não foram descritos na literatura estarem relacionados a doenças craniofaciais, sendo o maior número de variantes localizadas nos genes ou perto dos genes: TFAP2A, MSX1, PAX7, AXIN2, BMP4, SUMO1 e IRF6.

Um claro exemplo que apoia a nosso estudo embora não seja na região craniofacial é o estudo de Gupta et al,2017 onde a variante rs9349379 com atividade enhancer localizada no terceiro intron do gene PHACTR1 regula a expressão da endotelina 1 (EDN1), um gene localizado a 600 kb de PHACTR1. Os efeitos fisiológicos de EDN1 na vascularização pode desencadear doenças vasculares,

incluindo doença arterial coronariana, enxaqueca, dissecção da artéria cervical, displasia fibromuscular e hipertensão

Os mecanismos para o entendimento da associação de determinados SNPs com a fissuras orofaciais tem sido estudado por meio de diferentes modelos, in vitro e in vivo. A possibilidade da presença de SNPs em *enhancers* estarem modulando a expressão de determinados genes e, por isso, participarem da patogênese de doença, está ligada principalmente como a forma pela qual fatores de transcrição podem se ligar mais (ou menos) facilmente no que é determinado como motif em que tal SNP se localiza.

Considerações finais

As NSCLP têm despertado interesse na ciência desde tempos antigos e atualmente representam um dos maiores desafios por serem distúrbios comuns e complexos, melhorar a compreensão da etiologia desse distúrbio fornece o acesso a melhores cuidados clínicos individualizados e prevenção das NSCLP no mundo todo. Com a aplicação de técnicas modernas de genética molecular houve grande ajuda na identificação de variantes causais, genes e regiões envolvidas na etiologia das NSCLP. Coletando variantes associadas a fissuras labiais e/o palatinas não sindrômicas de grandes bibliotecas virtuais como o catalogo GWAS, PUBMED e DISGENET e com o análise dessas variantes no UCSC GENOME BROWSER HOME com dados de CHIP-seq de histonas, ATAC-seq e além do uso de NCBI, VISTA ENHANCER BROWSER e STAMP, foram achadas variantes inseridas em *enhancers* de células da crista neural humana que podem levar à formação de NSCLP. Dentre algumas análises em andamento no nosso estudo (dados não finalizados), foi possível prever que algumas variantes em determinados motifs modificam consideravelmente afinidade de fatores de transcrição, o que possivelmente poderia influenciar na transcrição do gene alvo, se validada a atividade de tais enhancers preditos. porém, avanços futuros em nossa compreensão da patogênese molecular das NSCLP são necessários e compreendem a validação funcional in vitro e in vivo das variantes achadas nesse estudo além de estudos que incluam a diversidade étnica e fenotípica.

7 CONCLUSÃO

Existem variantes genéticas associadas a fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas inseridas em elementos cis regulatórios de células da crista neural humana, tais variantes estão próximas a genes envolvidos com o desenvolvimento craniofacial, algumas tem atividade enhancer in vivo já estudada por meio de geração de camundongo transgênico e os motifs que tiveram inseridos essas variantes modificam a afinidade de ligação do fator de transcrição. Porém, tais variantes possam ser um dos fatores que estejam envolvidos nos mecanismos que levam a formação de fissuras orofaciais em determinados casos destas doenças.

REFERÊNCIAS

Alappat SR, Zhang Z, Suzuki K, Zhang X, Liu H, Jiang R, Yamada G, Chen Y. The cellular and molecular etiology of the cleft secondary palate in Fgf10 mutant mice. *Dev Biol*. 2005 Jan 1;277(1):102-13. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.09.010. PMID: 15572143.

Banerji J, Olson L, Schaffner W. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell*. 1983 Jul;33(3):729-40. doi: 10.1016/0092-8674(83)90015-6. PMID: 6409418.

Basch ML, Bronner-Fraser M, García-Castro MI. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):218-22. doi: 10.1038/nature04684. PMID: 16688176.

Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, Liang KY, Wu T, Murray T, Fallin MD, Redett RA, Raymond G, Schwender H, Jin SC, Cooper ME, Dunnwald M, Mansilla MA, Leslie E, Bullard S, Lidral AC, Moreno LM, Menezes R, Vieira AR, Petrin A, Wilcox AJ, Lie RT, Jabs EW, Wu-Chou YH, Chen PK, Wang H, Ye X, Huang S, Yeow V, Chong SS, Jee SH, Shi B, Christensen K, Melbye M, Doheny KF, Pugh EW, Ling H, Castilla EE, Czeizel AE, Ma L, Field LL, Brody L, Pangilinan F, Mills JL, Molloy AM, Kirke PN, Scott JM, Arcos-Burgos M, Scott AF. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet*. 2010 Jun;42(6):525-9. doi: 10.1038/ng.580. Epub 2010 May 2. Erratum in: *Nat Genet*. 2010 Aug;42(8):727. Scott, James M [corrected to Scott, John M]. PMID: 20436469; PMCID: PMC2941216.

Berman BP, Nibu Y, Pfeiffer BD, Tomancak P, Celniker SE, Levine M, Rubin GM, Eisen MB. Exploiting transcription factor binding site clustering to identify cis-regulatory modules involved in pattern formation in the *Drosophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 22;99(2):757-62. doi: 10.1073/pnas.231608898. PMID: 11805330; PMCID: PMC117378.

Bille C, Knudsen LB, Christensen K. Changing lifestyles and oral clefts occurrence in Denmark. *Cleft Palate Craniofac J*. 2005 May;42(3):255-9. doi: 10.1597/03-139.1. PMID: 15865458; PMCID: PMC2832738.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*. 1995 Nov;172(1):126-38. doi: 10.1006/dbio.1995.0010. PMID: 7589793.

Brown RP, Feder ME. Reverse transcriptional profiling: non-correspondence of transcript level variation and proximal promoter polymorphism. *BMC Genomics*. 2005 Aug 17;6:110. doi: 10.1186/1471-2164-6-110. PMID: 16107220; PMCID: PMC1192798.

Brugmann SA, Goodnough LH, Gregorieff A, Leucht P, ten Berge D, Fuerer C, Clevers H, Nusse R, Helms JA. Wnt signaling mediates regional specification in the vertebrate face. *Development*. 2007 Sep;134(18):3283-95. doi: 10.1242/dev.005132. Epub 2007 Aug 15. PMID: 17699607.

Brugmann SA, Tapadia MD, Helms JA. The molecular origins of species-specific facial pattern. *Curr Top Dev Biol*. 2006;73:1-42. doi: 10.1016/S0070-2153(05)73001-5. PMID: 16782454.

Buecker C, Wysocka J. Enhancers as information integration hubs in development: lessons from genomics. *Trends Genet*. 2012 Jun;28(6):276-84. doi: 10.1016/j.tig.2012.02.008. Epub 2012 Apr 7. PMID: 22487374; PMCID: PMC5064438.

Bulger M, Groudine M. Enhancers: the abundance and function of regulatory sequences beyond promoters. *Dev Biol*. 2010 Mar 15;339(2):250-7. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.11.035. Epub 2009 Dec 16. PMID: 20025863; PMCID: PMC3060611.

Bulger M, Groudine M. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*. 2011 Feb 4;144(3):327-39. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.024. Erratum in: *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):825. PMID: 21295696; PMCID: PMC3742076.

Butali A, Suzuki S, Cooper ME, Mansilla AM, Cuenco K, Leslie EJ, Suzuki Y, Niimi T, Yamamoto M, Ayanga G, Erkhembaatar T, Furukawa H, Fujiwawa K, Imura H, Petrin AL, Natsume N, Beaty TH, Marazita ML, Murray JC. Replication of genome wide association identified candidate genes confirm the role of common and rare variants in PAX7 and VAX1 in the etiology of nonsyndromic CL(P). *Am J Med Genet A*. 2013

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

May;161A(5):965-72. doi: 10.1002/ajmg.a.35749. Epub 2013 Mar 5. PMID: 23463464; PMCID: PMC3634899.

Cárdenas-Nieto, D. M., Leone, P. E., Paz-y-Miño, C., & Forero-Castro, M. (2019). Polimorfismos genéticos em pacientes com fissuras labiais y/o palatinas no sindrômicos. *Ciência em Desenvolvimento*, 10(2), 59–92. <https://doi.org/10.19053/01217488.v10.n2.2019.9838>

Celli J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, Newbury-Ecob R, Hennekam RC, Van Buggenhout G, van Haeringen A, Woods CG, van Essen AJ, de Waal R, Vriend G, Haber DA, Yang A, McKeon F, Brunner HG, van Bokhoven H. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell*. 1999 Oct 15;99(2):143-53. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81646-3. PMID: 10535733.

Chai Y, Maxson RE Jr. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn*. 2006 Sep;235(9):2353-75. doi: 10.1002/dvdy.20833. PMID: 16680722.

Chalpe AJ, Prasad M, Henke AJ, Paulson AF. Regulation of cadherin expression in the chicken neural crest by the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cell Adh Migr*. 2010 Jul-Sep;4(3):431-8. doi: 10.4161/cam.4.3.12138. Epub 2010 Jul 23. PMID: 20523111; PMCID: PMC2958620.

Christensen K, Juel K, Herskind AM, Murray JC. Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. *BMJ*. 2004 Jun 12;328(7453):1405. doi: 10.1136/bmj.38106.559120.7C. Epub 2004 May 14. PMID: 15145797; PMCID: PMC421777.

Clay MR, Halloran MC. Regulation of cell adhesions and motility during initiation of neural crest migration. *Curr Opin Neurobiol*. 2011 Feb;21(1):17-22. doi: 10.1016/j.conb.2010.09.013. Epub 2010 Oct 21. PMID: 20970990; PMCID: PMC3049825.

Cordero DR, Brugmann S, Chu Y, Bajpai R, Jame M, Helms JA. Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. *Am J Med Genet A*. 2011

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International ommittee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Feb;155A(2):270-9. doi: 10.1002/ajmg.a.33702. Epub 2010 Dec 10. PMID: 21271641; PMCID: PMC3039913.

Creyghton, M. P., Cheng, A. W., Welstead, G. G., Kooistra, T., Carey, B. W., Steine, E. J., Hanna, J., Lodato, M. A., Frampton, G. M., Sharp, P. A., Boyer, L. A., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21931–21936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016071107>

De Calisto J, Araya C, Marchant L, Riaz CF, Mayor R. Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development*. 2005 Jun;132(11):2587-97. doi: 10.1242/dev.01857. Epub 2005 Apr 27. PMID: 15857909.

Del Barrio MG, Nieto MA. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development*. 2002 Apr;129(7):1583-93. PMID: 11923196

Deshpande AS, Goudy SL. Cellular and molecular mechanisms of cleft palate development. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2018 Nov 15;4(1):160-164. doi: 10.1002/liv.2.214. PMID: 30828634; PMCID: PMC6383315.

Dietz A, Pedersen DA, Jacobsen R, Wehby GL, Murray JC, Christensen K. Risk of breast cancer in families with cleft lip and palate. *Ann Epidemiol*. 2012 Jan;22(1):37-42. doi: 10.1016/j.annepidem.2011.09.003. Epub 2011 Oct 28. PMID: 22037380; PMCID: PMC3237814.

Ding H, Wu X, Boström H, Kim I, Wong N, Tsoi B, O'Rourke M, Koh GY, Soriano P, Betsholtz C, Hart TC, Marazita ML, Field LL, Tam PP, Nagy A. A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR- α signaling. *Nat Genet*. 2004 Oct;36(10):1111-6. doi: 10.1038/ng1415. Epub 2004 Sep 7. PMID: 15361870.

Dixon J, Jones NC, Sandell LL, Jayasinghe SM, Crane J, Rey JP, Dixon MJ, Trainor PA. Tcof1/Treacle is required for neural crest cell formation and proliferation deficiencies that cause craniofacial abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

5;103(36):13403-8. doi: 10.1073/pnas.0603730103. Epub 2006 Aug 28. PMID: 16938878; PMCID: PMC1557391.

Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011 Mar;12(3):167-78. doi: 10.1038/nrg2933. PMID: 21331089; PMCID: PMC3086810.

Doni Jayavelu N, Jajodia A, Mishra A, Hawkins RD. Candidate silencer elements for the human and mouse genomes. *Nat Commun.* 2020 Feb 26;11(1):1061. doi: 10.1038/s41467-020-14853-5. PMID: 32103011; PMCID: PMC7044160.

Dudas M, Kim J, Li WY, Nagy A, Larsson J, Karlsson S, Chai Y, Kaartinen V. Epithelial and ectomesenchymal role of the type I TGF-beta receptor ALK5 during facial morphogenesis and palatal fusion. *Dev Biol.* 2006 Aug 15;296(2):298-314. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.05.030. Epub 2006 May 27. PMID: 16806156; PMCID: PMC1557652.

Elgar G, Vavouri T. Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes. *Trends Genet.* 2008 Jul;24(7):344-52. doi: 10.1016/j.tig.2008.04.005. Epub 2008 May 29. PMID: 18514361.

ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012 Sep 6;489(7414):57-74. doi: 10.1038/nature11247. PMID: 22955616; PMCID: PMC3439153.

Felsenfeld G. The evolution of epigenetics. *Perspect Biol Med.* 2014 Winter;57(1):132-48. doi: 10.1353/pbm.2014.0004. PMID: 25345707.

Filipowicz W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell.* 2005 Jul 15;122(1):17-20. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.023. PMID: 16009129.

Franke M., Ibrahim D.M., Andrey G., Schwarzer W., Heinrich V., Schöpflin R., Kraft K., Kempfer R., Jerković I., Chan W.-L. Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. *Nature.* 2016;538:265–269.

Funato N, Nakamura M. Identification of shared and unique gene families associated with oral clefts. *Int J Oral Sci.* 2017 Jun;9(2):104-109. doi: 10.1038/ijos.2016.56. Epub 2017 Jan 20. PMID: 28106045; PMCID: PMC5518969.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Gaszner M, Felsenfeld G. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet.* 2006 Sep;7(9):703-13. doi: 10.1038/nrg1925. Epub 2006 Aug 15. PMID: 16909129.

Goudy, S., Law, A., Sanchez, G., Baldwin, H. S., & Brown, C. (2010). Tbx1 is necessary for palatal elongation and elevation. *Mechanisms of development*, 127(5-6), 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2010.03.001>

Graham A. Development of the pharyngeal arches. *Am J Med Genet A.* 2003 Jun 15;119A(3):251-6. doi: 10.1002/ajmg.a.10980. PMID: 12784288.

Granier C, Gurchenkov V, Perea-Gomez A, Camus A, Ott S, Papanayotou C, Iranzo J, Moreau A, Reid J, Koentges G, Sabéran-Djoneidi D, Collignon J. Nodal cis-regulatory elements reveal epiblast and primitive endoderm heterogeneity in the peri-implantation mouse embryo. *Dev Biol.* 2011 Jan 15;349(2):350-62. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.10.036. Epub 2010 Nov 1. PMID: 21047506.

Gupta RM, Hadaya J, Trehan A, Zekavat SM, Roselli C, Klarin D, Emdin CA, Hilvering CRE, Bianchi V, Mueller C, Khera AV, Ryan RJH, Engreitz JM, Issner R, Shores N, Epstein CB, de Laat W, Brown JD, Schnabel RB, Bernstein BE, Kathiresan S. A Genetic Variant Associated with Five Vascular Diseases Is a Distal Regulator of Endothelin-1 Gene Expression. *Cell.* 2017 Jul 27;170(3):522-533.e15. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.049. PMID: 28753427; PMCID: PMC5785707.

Hallonet M, Hollemann T, Pieler T, Gruss P. Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes Dev.* 1999 Dec 1;13(23):3106-14. doi: 10.1101/gad.13.23.3106. PMID: 10601036; PMCID: PMC317183.

Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW, Ching KA, Antosiewicz-Bourget JE, Liu H, Zhang X, Green RD, Lobanenkov VV, Stewart R, Thomson JA, Crawford GE, Kellis M, Ren B. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature.* 2009 May 7;459(7243):108-12. doi: 10.1038/nature07829. Epub 2009 Mar 18. PMID: 19295514; PMCID: PMC2910248.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet.* 2007 Mar;39(3):311-8. doi: 10.1038/ng1966. Epub 2007 Feb 4. PMID: 17277777.

Hill C, Jacobs B, Kennedy L, Rohde S, Zhou B, Baldwin S, Goudy S. Cranial neural crest deletion of VEGFa causes cleft palate with aberrant vascular and bone development. *Cell Tissue Res.* 2015 Sep;361(3):711-22. doi: 10.1007/s00441-015-2150-7. Epub 2015 Mar 12. PMID: 25759071.

Hill CR, Jacobs BH, Brown CB, Barnett JV, Goudy SL. Type III transforming growth factor beta receptor regulates vascular and osteoblast development during palatogenesis. *Dev Dyn.* 2015 Feb;244(2):122-33. doi: 10.1002/dvdy.24225. Epub 2014 Dec 1. PMID: 25382630; PMCID: PMC4310801.

Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development.* 2003 Oct;130(20):4769-84. doi: 10.1242/dev.00721. PMID: 12952899.

Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 1975 Jan 24;187(4173):226-32. PMID: 1111098.

Hovorakova M, Lesot H, Peterka M, Peterkova R. Early development of the human dentition revisited. *J Anat.* 2018 Aug;233(2):135-145. doi: 10.1111/joa.12825. Epub 2018 May 10. PMID: 29745448; PMCID: PMC6036925.

Inman GJ, Nicolás FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell.* 2002 Aug;10(2):283-94. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00585-3. PMID: 12191474.

Inman GJ. Linking Smads and transcriptional activation. *Biochem J.* 2005 Feb 15;386(Pt 1):e1-e3. doi: 10.1042/bj20042133. PMID: 15702493; PMCID: PMC1134782.

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1074-80. doi: 10.1126/science.1063127. PMID: 11498575.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Jeong J, Mao J, Tenzen T, Kottmann AH, McMahon AP. Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev.* 2004 Apr 15;18(8):937-51. doi: 10.1101/gad.1190304. PMID: 15107405; PMCID: PMC395852.

Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat Genet.* 2001 Mar;27(3):286-91. doi: 10.1038/85845. PMID: 11242110.

Ji Y, Garland MA, Sun B, Zhang S, Reynolds K, McMahon M, Rajakumar R, Islam MS, Liu Y, Chen Y, Zhou CJ. Cellular and developmental basis of orofacial clefts. *Birth Defects Res.* 2020 Nov;112(19):1558-1587. doi: 10.1002/bdr2.1768. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32725806; PMCID: PMC7901717.

Jin YR, Han XH, Taketo MM, Yoon JK. Wnt9b-dependent FGF signaling is crucial for outgrowth of the nasal and maxillary processes during upper jaw and lip development. *Development.* 2012 May;139(10):1821-30. doi: 10.1242/dev.075796. Epub 2012 Mar 29. PMID: 22461561; PMCID: PMC3328181.

Jones JL, Canady JW, Brookes JT, Wehby GL, L'Heureux J, Schutte BC, Murray JC, Dunnwald M. Wound complications after cleft repair in children with Van der Woude syndrome. *J Craniofac Surg.* 2010 Sep;21(5):1350-3. doi: 10.1097/SCS.0b013e3181ec6aad. PMID: 20856020; PMCID: PMC3018692.

Jones MC. Etiology of facial clefts: prospective evaluation of 428 patients. *Cleft Palate J.* 1988 Jan;25(1):16-20. PMID: 3422594.

Jones NC, Lynn ML, Gaudenz K, Sakai D, Aoto K, Rey JP, Glynn EF, Ellington L, Du C, Dixon J, Dixon MJ, Trainor PA. Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat Med.* 2008 Feb;14(2):125-33. doi: 10.1038/nm1725. Epub 2008 Feb 3. PMID: 18246078; PMCID: PMC3093709.

Jones NC, Trainor PA. Role of morphogens in neural crest cell determination. *J Neurobiol.* 2005 Sep 15;64(4):388-404. doi: 10.1002/neu.20162. PMID: 16041760.

Jouve de la Barreda N. La epigenética. Sus mecanismos y significado en la regulación génica [Epigenetics. Mechanism and significance in gene regulation]. *Cuad Bioet.* 2020 Sep-Dec;31(103):405-419. Spanish. doi: 10.30444/CB.79. PMID: 33375806.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International ommittee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol.* 1990 Jun;110(6):2195-207. doi: 10.1083/jcb.110.6.2195. PMID: 2351696; PMCID: PMC2116133.

Julia Welzenbach, Nigel L. Hammond, Miloš Nikolić, Frederic Thieme, Nina Ishorst, Elizabeth J. Leslie, Seth M. Weinberg, Terri H. Beaty, Mary L. Marazita, Elisabeth Mangold, Michael Knapp, Justin Cotney, Alvaro Rada-Iglesias, Michael J. Dixon, Kerstin U. Ludwig. Integrative approaches generate insights into the architecture of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Human Genetics and Genomics Advances*, 2021; 2 (3): 100038 DOI: [10.1016/j.xhgg.2021.100038](https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2021.100038)

Julia Welzenbach, Nigel L. Hammond, Miloš Nikolić, Frederic Thieme, Nina Ishorst, Elizabeth J. Leslie, Seth M. Weinberg, Terri H. Beaty, Mary L. Marazita, Elisabeth Mangold, Michael Knapp, Justin Cotney, Alvaro Rada-Iglesias, Michael J. Dixon, Kerstin U. Ludwig. Integrative approaches generate insights into the architecture of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Human Genetics and Genomics Advances*, 2021; 2 (3): 100038 DOI: [10.1016/j.xhgg.2021.100038](https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2021.100038)

Kaucka M, Ivashkin E, Gyllborg D, Zikmund T, Tesarova M, Kaiser J, Xie M, Petersen J, Pachnis V, Nicolis SK, Yu T, Sharpe P, Arenas E, Brismar H, Blom H, Clevers H, Suter U, Chagin AS, Fried K, Hellander A, Adameyko I. Analysis of neural crest-derived clones reveals novel aspects of facial development. *Sci Adv.* 2016 Aug 3;2(8):e1600060. doi: 10.1126/sciadv.1600060. PMID: 27493992; PMCID: PMC4972470.

Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007;9:289-320. doi: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037. PMID: 17391067.

Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 1994 Jan;8(2):133-46. doi: 10.1101/gad.8.2.133. PMID: 8299934.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Ko JM. Genetic Syndromes Associated with Craniosynostosis. *J Korean Neurosurg Soc.* 2016 May;59(3):187-91. doi: 10.3340/jkns.2016.59.3.187. Epub 2016 May 10. PMID: 27226847; PMCID: PMC4877538.

Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de Lima RL, Daack-Hirsch S, Sander A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Lammer EJ, Aylsworth AS, Ardinger HH, Lidral AC, Pober BR, Moreno L, Arcos-Burgos M, Valencia C, Houdayer C, Bahuau M, Moretti-Ferreira D, Richieri-Costa A, Dixon MJ, Murray JC. Mutations in *IRF6* cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet.* 2002 Oct;32(2):285-9. doi: 10.1038/ng985. Epub 2002 Sep 3. PMID: 12219090; PMCID: PMC3169431.

Kreiborg S, Cohen MM Jr. Is craniofacial morphology in Apert and Crouzon syndromes the same? *Acta Odontol Scand.* 1998 Dec;56(6):339-41. doi: 10.1080/000163598428275. PMID: 10066112.

Krijger PH, de Laat W. Regulation of disease-associated gene expression in the 3D genome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Dec;17(12):771-782. doi: 10.1038/nrm.2016.138. Epub 2016 Nov 9. PMID: 27826147.

Kumar D, Nitzan E, Kalcheim C. YAP promotes neural crest emigration through interactions with BMP and Wnt activities. *Cell Commun Signal.* 2019 Jun 22;17(1):69. doi: 10.1186/s12964-019-0383-x. PMID: 31228951; PMCID: PMC6589182.

Lagha, M., Bothma, J. P., & Levine, M. (2012). Mechanisms of transcriptional precision in animal development. *Trends in genetics: TIG*, 28(8), 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.03.006>

Lan Y, Jiang R. Sonic hedgehog signaling regulates reciprocal epithelial-mesenchymal interactions controlling palatal outgrowth. *Development.* 2009 Apr;136(8):1387-96. doi: 10.1242/dev.028167. PMID: 19304890; PMCID: PMC2687468.

Laugsch M., Bartusel M., Rehim R., Alirzayeva H., Karaolidou A., Crispatzu G., Zentis P., Nikolic M., Bleckwehl T., Kolovos P. Modeling the Pathological Long-Range Regulatory Effects of Human Structural Variation with Patient-Specific hiPSCs. *Cell Stem Cell.* 2019;24:736–752.e12

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Lee JT. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science*. 2012 Dec 14;338(6113):1435-9. doi: 10.1126/science.1231776. PMID: 23239728.

Lennon CJ, Birkeland AC, Nuñez JA, Su GH, Lanzano P, Guzman E, Celis K, Eisig SB, Hoffman D, Rendon MT, Ostos H, Chung WK, Haddad J Jr. Association of candidate genes with nonsyndromic clefts in Honduran and Colombian populations. *Laryngoscope*. 2012 Sep;122(9):2082-7. doi: 10.1002/lary.23394. Epub 2012 Jul 2. PMID: 22753311.

Leslie EJ, Mansilla MA, Biggs LC, Schuette K, Bullard S, Cooper M, Dunnwald M, Lidral AC, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome-wide association on chromosome 1p22. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012 Nov;94(11):934-42. doi: 10.1002/bdra.23076. Epub 2012 Sep 24. PMID: 23008150; PMCID: PMC3501616.

Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013 Nov;163C(4):246-58. doi: 10.1002/ajmg.c.31381. Epub 2013 Oct 4. PMID: 24124047; PMCID: PMC3925974.

Levi B, Brugman S, Wong VW, Grova M, Longaker MT, Wan DC. Palatogenesis: engineering, pathways and pathologies. *Organogenesis*. 2011 Oct-Dec;7(4):242-54. doi: 10.4161/org.7.4.17926. Epub 2011 Oct 1. PMID: 21964245; PMCID: PMC3265826.

Li J, Rodriguez G, Han X, Janečková E, Kahng S, Song B, Chai Y. Regulatory Mechanisms of Soft Palate Development and Malformations. *J Dent Res*. 2019 Aug;98(9):959-967. doi: 10.1177/0022034519851786. Epub 2019 May 31. PMID: 31150594; PMCID: PMC6651766.

Liang HL, Nien CY, Liu HY, Metzstein MM, Kirov N, Rushlow C. The zinc-finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*. *Nature*. 2008 Nov 20;456(7220):400-3. doi: 10.1038/nature07388. Epub 2008 Oct 19. PMID: 18931655; PMCID: PMC2597674.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Lin-Shiao E, Lan Y, Welzenbach J, Alexander KA, Zhang Z, Knapp M, Mangold E, Sammons M, Ludwig KU, Berger SL. p63 establishes epithelial enhancers at critical craniofacial development genes. *Sci Adv.* 2019 May 1;5(5):eaaw0946. doi: 10.1126/sciadv.aaw0946. PMID: 31049400; PMCID: PMC6494499.

Liu H, Duncan K, Helverson A, Kumari P, Mumm C, Xiao Y, Carlson JC, Darbellay F, Visel A, Leslie E, Breheny P, Erives AJ, Cornell RA. Analysis of zebrafish periderm enhancers facilitates identification of a regulatory variant near human *KRT8/18*. *Elife.* 2020 Feb 7;9:e51325. doi: 10.7554/eLife.51325. PMID: 32031521; PMCID: PMC7039683.

Long HK, Osterwalder M, Welsh IC, Hansen K, Davies JOJ, Liu YE, Koska M, Adams AT, Aho R, Arora N, Ikeda K, Williams RM, Sauka-Spengler T, Porteus MH, Mohun T, Dickel DE, Swigut T, Hughes JR, Higgs DR, Visel A, Selleri L, Wysocka J. Loss of Extreme Long-Range Enhancers in Human Neural Crest Drives a Craniofacial Disorder. *Cell Stem Cell.* 2020 Nov 5;27(5):765-783.e14. doi: 10.1016/j.stem.2020.09.001. Epub 2020 Sep 28. PMID: 32991838; PMCID: PMC7655526.

Ludwig KU, Mangold E, Herms S, Nowak S, Reutter H, Paul A, Becker J, Herberz R, AlChawa T, Nasser E, Böhmer AC, Mattheisen M, Alblas MA, Barth S, Kluck N, Lauster C, Braumann B, Reich RH, Hemprich A, Pötzsch S, Blaumeiser B, Daratsianos N, Kreusch T, Murray JC, Marazita ML, Ruczinski I, Scott AF, Beaty TH, Kramer FJ, Wienker TF, Steegers-Theunissen RP, Rubini M, Mossey PA, Hoffmann P, Lange C, Cichon S, Propping P, Knapp M, Nöthen MM. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nat Genet.* 2012 Sep;44(9):968-71. doi: 10.1038/ng.2360. Epub 2012 Aug 5. PMID: 22863734; PMCID: PMC3598617.

Lumsden A, Sprawson N, Graham A. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development.* 1991 Dec;113(4):1281-91. PMID: 1811942.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Lupiáñez D.G., Kraft K., Heinrich V., Krawitz P., Brancati F., Klopocki E., Horn D., Kayserili H., Opitz J.M., Laxova R. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*. 2015;161:1012–1025.

Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S, Reutter H, de Assis NA, Chawa TA, Mattheisen M, Steffens M, Barth S, Kluck N, Paul A, Becker J, Lauster C, Schmidt G, Braumann B, Scheer M, Reich RH, Hemprich A, Pötzsch S, Blaumeiser B, Moebus S, Krawczak M, Schreiber S, Meitinger T, Wichmann HE, Steegers-Theunissen RP, Kramer FJ, Cichon S, Propping P, Wienker TF, Knapp M, Rubini M, Mossey PA, Hoffmann P, Nöthen MM. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet*. 2010 Jan;42(1):24-6. doi: 10.1038/ng.506. Epub 2009 Dec 20. PMID: 20023658.

Mansouri A, Stoykova A, Torres M, Gruss P. Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7-/- mutant mice. *Development*. 1996 Mar;122(3):831-8. doi: 10.1242/dev.122.3.831. PMID: 8631261.

Marazita ML. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012;13:263-83. doi: 10.1146/annurev-genom-090711-163729. Epub 2012 Jun 6. PMID: 22703175; PMCID: PMC3760163.

Markstein M, Markstein P, Markstein V, Levine MS. Genome-wide analysis of clustered Dorsal binding sites identifies putative target genes in the Drosophila embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 22;99(2):763-8. doi: 10.1073/pnas.012591199. Epub 2001 Dec 18. PMID: 11752406; PMCID: PMC117379.

Martínez-Morales PL, Díez del Corral R, Olivera-Martínez I, Quiroga AC, Das RM, Barbas JA, Storey KG, Morales AV. FGF and retinoic acid activity gradients control the timing of neural crest cell emigration in the trunk. *J Cell Biol*. 2011 Aug 8;194(3):489-503. doi: 10.1083/jcb.201011077. Epub 2011 Aug 1. PMID: 21807879; PMCID: PMC3153641.

Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, Reynolds AP, Sandstrom R, Qu H, Brody J, Shafer A, Neri F, Lee K, Kutayavin T, Stehling-Sun S, Johnson AK, Canfield TK, Giste E, Diegel M, Bates D, Hansen RS, Neph S, Sabo PJ,

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International ommittee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Heimfeld S, Raubitschek A, Ziegler S, Cotsapas C, Sotoodehnia N, Glass I, Sunyaev SR, Kaul R, Stamatoyannopoulos JA. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science*. 2012 Sep 7;337(6099):1190-5. doi: 10.1126/science.1222794. Epub 2012 Sep 5. PMID: 22955828; PMCID: PMC3771521.

May D, Blow MJ, Kaplan T, McCulley DJ, Jensen BC, Akiyama JA, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Afzal V, Simpson PC, Rubin EM, Black BL, Bristow J, Pennacchio LA, Visel A. Large-scale discovery of enhancers from human heart tissue. *Nat Genet*. 2011 Dec 4;44(1):89-93. doi: 10.1038/ng.1006. PMID: 22138689; PMCID: PMC3246570.

McGrath JA, Duijf PH, Doetsch V, Irvine AD, de Waal R, Vanmolkot KR, Wessagowit V, Kelly A, Atherton DJ, Griffiths WA, Orlow SJ, van Haeringen A, Ausems MG, Yang A, McKeon F, Bamshad MA, Brunner HG, Hamel BC, van Bokhoven H. Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum Mol Genet*. 2001 Feb 1;10(3):221-9. doi: 10.1093/hmg/10.3.221. PMID: 11159940.

Medio M, Yeh E, Popelut A, Babajko S, Berdal A, Helms JA. Wnt/ β -catenin signaling and Msx1 promote outgrowth of the maxillary prominences. *Front Physiol*. 2012 Sep 21;3:375. doi: 10.3389/fphys.2012.00375. PMID: 23055979; PMCID: PMC3457051.

Méndez-Maldonado K, Vega-López GA, Aybar MJ, Velasco I. Neurogenesis From Neural Crest Cells: Molecular Mechanisms in the Formation of Cranial Nerves and Ganglia. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Aug 7;8:635. doi: 10.3389/fcell.2020.00635. PMID: 32850790; PMCID: PMC7427511.

Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultschi AI, Morrow BE, Kucherlapati R. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):619-29. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00247-1. PMID: 11239417.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Meyers GA, Orlow SJ, Munro IR, Przylepa KA, Jabs EW. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat Genet.* 1995 Dec;11(4):462-4. doi: 10.1038/ng1295-462. PMID: 7493034.

Milunsky JM, Maher TA, Zhao G, Roberts AE, Stalker HJ, Zori RT, Burch MN, Clemens M, Mulliken JB, Smith R, Lin AE. TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008 May;82(5):1171-7. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.03.005. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 2009 Feb;84(2):301. PMID: 18423521; PMCID: PMC2427243.

Montavon T, Soshnikova N, Mascrez B, Joye E, Thevenet L, Splinter E, de Laat W, Spitz F, Duboule D. A regulatory archipelago controls Hox genes transcription in digits. *Cell.* 2011 Nov 23;147(5):1132-45. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.023. PMID: 22118467.

Moore Keith L, Dailey Arthur F, Angur Anne M.R., Anatomia de Moore com orientação clínica: 7.ed. Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet.* 2009 Nov 21;374(9703):1773-85. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60695-4. Epub 2009 Sep 9. PMID: 19747722.

Mossey PA, Shaw WC, Munger RG, Murray JC, Murthy J, Little J. Global oral health inequalities: challenges in the prevention and management of orofacial clefts and potential solutions. *Adv Dent Res.* 2011 May;23(2):247-58. doi: 10.1177/0022034511402083. PMID: 21490237; PMCID: PMC6699117.

Mullen AC, Orlando DA, Newman JJ, Lovén J, Kumar RM, Bilodeau S, Reddy J, Guenther MG, DeKoter RP, Young RA. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell.* 2011 Oct 28;147(3):565-76. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.050. PMID: 22036565; PMCID: PMC3212730.

Nasser E, Mangold E, Tradowsky DC, Fier H, Becker J, Boehmer AC, Herberz R, Fricker N, Barth S, Wahle P, Nowak S, Reutter H, Reich RH, Lauster C, Braumann B, Kreusch T, Hemprich A, Pötzsch B, Hoffmann P, Kramer FJ, Knapp M, Lange C, Nöthen MM, Ludwig KU. Resequencing of VAX1 in patients with nonsyndromic cleft lip

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012 Nov;94(11):925-33. doi: 10.1002/bdra.23078. Epub 2012 Oct 18. PMID: 23081944.

Ngan CY, Wong CH, Tjong H, Wang W, Goldfeder RL, Choi C, He H, Gong L, Lin J, Urban B, Chow J, Li M, Lim J, Philip V, Murray SA, Wang H, Wei CL. Chromatin interaction analyses elucidate the roles of PRC2-bound silencers in mouse development. *Nat Genet*. 2020 Mar;52(3):264-272. doi: 10.1038/s41588-020-0581-x. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32094912; PMCID: PMC7869692.

Nien CY, Liang HL, Butcher S, Sun Y, Fu S, Gocha T, Kirov N, Manak JR, Rushlow C. Temporal coordination of gene networks by Zelda in the early *Drosophila* embryo. *PLoS Genet*. 2011 Oct;7(10):e1002339. doi: 10.1371/journal.pgen.1002339. Epub 2011 Oct 20. PMID: 22028675; PMCID: PMC3197689.

Noden DM. The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev Biol*. 1983 Mar;96(1):144-65. doi: 10.1016/0012-1606(83)90318-4. PMID: 6825950.

Noonan JP, McCallion AS. Genomics of long-range regulatory elements. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:1-23. doi: 10.1146/annurev-genom-082509-141651. PMID: 20438361.

Ong CT, Corces VG. Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nat Rev Genet*. 2011 Apr;12(4):283-93. doi: 10.1038/nrg2957. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21358745; PMCID: PMC3175006.

Pan Y, Zhang W, Du Y, Tong N, Han Y, Zhang H, Wang M, Ma J, Wan L, Wang L. Different roles of two novel susceptibility loci for nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population. *Am J Med Genet A*. 2011 Sep;155A(9):2180-5. doi: 10.1002/ajmg.a.34170. Epub 2011 Aug 10. PMID: 21834038.

Pang B, Snyder MP. Systematic identification of silencers in human cells. *Nat Genet*. 2020 Mar;52(3):254-263. doi: 10.1038/s41588-020-0578-5. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32094911; PMCID: PMC7148122.

Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:137823. doi: 10.1155/2015/137823. Epub 2015 Jan 29. PMID: 25709154; PMCID: PMC4325469.

Prescott SL, Srinivasan R, Marchetto MC, Grishina I, Narvaiza I, Selleri L, Gage FH, Swigut T, Wysocka J. Enhancer divergence and cis-regulatory evolution in the human and chimp neural crest. *Cell.* 2015 Sep 24;163(1):68-83. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.036. Epub 2015 Sep 10. PMID: 26365491; PMCID: PMC4848043.

Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T. Se requiere factor de crecimiento transformante beta 3 para la fusión del paladar secundario. *Nat Genet.* Diciembre de 1995; 11 (4): 409-14. doi: 10.1038 / ng1295-409. PMID: 7493021; PMCID: PMC3855390.

Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature.* 2011 Feb 10;470(7333):279-83. doi: 10.1038/nature09692. Epub 2010 Dec 15. PMID: 21160473; PMCID: PMC4445674.

Rada-Iglesias, A., Bajpai, R., Prescott, S., Brugmann, S. A., Swigut, T., & Wysocka, J. (2012). Epigenomic annotation of enhancers predicts transcriptional regulators of human neural crest. *Cell stem cell*, 11(5), 633–648. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.006>

Rao S, Ahmad K, Ramachandran S. Cooperative binding between distant transcription factors is a hallmark of active enhancers. *Mol Cell.* 2021 Apr 15;81(8):1651-1665.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2021.02.014. Epub 2021 Mar 10. PMID: 33705711; PMCID: PMC8052300.

Reardon W, Winter RM, Rutland P, Pulleyn LJ, Jones BM, Malcolm S. Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat Genet.* 1994 Sep;8(1):98-103. doi: 10.1038/ng0994-98. PMID: 7987400.

Richardson RJ, Dixon J, Jiang R, Dixon MJ. Integration of IRF6 and Jagged2 signalling is essential for controlling palatal adhesion and fusion competence. *Hum Mol Genet.* 2009 Jul 15;18(14):2632-42. doi: 10.1093/hmg/ddp201. Epub 2009 May 13. PMID: 19439425; PMCID: PMC2701335.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International ommittee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Rickels R, Shilatifard A. Enhancer Logic and Mechanics in Development and Disease. *Trends Cell Biol.* 2018 Aug;28(8):608-630. doi: 10.1016/j.tcb.2018.04.003. Epub 2018 May 11. PMID: 29759817.

Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet.* 1975;14(1):9-25. doi: 10.1159/000130315. PMID: 1093816.

Sadle TW, Lagman *Embriologia medica*:14. ed. Estados Unidos: Wolters Kluwer,2013. Pag 478

Sánchez-Gaya, V., Mariner-Faulí, M., & Rada-Iglesias, A. (2020). Rare or Overlooked? Structural Disruption of Regulatory Domains in Human Neurocristopathies. *Frontiers in genetics*, 11, 688. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00688>

Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994 Apr;6(4):348-56. doi: 10.1038/ng0494-348. PMID: 7914451.

Savarese F, Grosschedl R. Blurring cis and trans in gene regulation. *Cell.* 2006 Jul 28;126(2):248-50. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.008. PMID: 16873057.

Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jan 1;29(1):308-11. doi: 10.1093/nar/29.1.308. PMID: 11125122; PMCID: PMC29783.

Silva HPVD, Arruda TTS, Souza KSC, Bezerra JF, Leite GCP, Brito MEF, Lima VMGDM, Luchessi AD, Bortolin RH, Ururahy MAG, Rezende AA. Risk factors and comorbidities in Brazilian patients with orofacial clefts. *Braz Oral Res.* 2018;32:e24. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0024. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29641641.

Slavotinek AM, Chao R, Vacik T, Yahyavi M, Abouzeid H, Bardakjian T, Schneider A, Shaw G, Sherr EH, Lemke G, Youssef M, Schorderet DF. VAX1 mutation associated with microphthalmia, corpus callosum agenesis, and orofacial clefting: the first description of a VAX1 phenotype in humans. *Hum Mutat.* 2012 Feb;33(2):364-8. doi: 10.1002/humu.21658. Epub 2011 Dec 27. PMID: 22095910; PMCID: PMC3401628.

Smith E, Shilatifard A. Enhancer biology and enhanceropathies. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Mar;21(3):210-9. doi: 10.1038/nsmb.2784. PMID: 24599251.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International ommittee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Sousa GF, Roncalli AG. Orofacial clefts in Brazil and surgical rehabilitation under the Brazilian National Health System. *Braz Oral Res.* 2017 Mar 30;31:e23. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0023. PMID: 28380087.

Spitz F. Gene regulation at a distance: From remote enhancers to 3D regulatory ensembles. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2016; 57:57–67.

Sull JW, Liang KY, Hetmanski JB, Fallin MD, Ingersoll RG, Park J, Wu-Chou YH, Chen PK, Chong SS, Cheah F, Yeow V, Park BY, Jee SH, Jabs EW, Redett R, Scott AF, Beaty TH. Maternal transmission effects of the PAX genes among cleft case-parent trios from four populations. *Eur J Hum Genet.* 2009 Jun;17(6):831-9. doi: 10.1038/ejhg.2008.250. Epub 2009 Jan 14. PMID: 19142206; PMCID: PMC2760446.

Suwa F, Jin Y, Lu H, Li X, Tipoe GL, Lau TY, Tamada Y, Kuroki K, Fang YR. Alteration of apoptosis in cleft palate formation and ectomesenchymal stem cells influenced by retinoic acid. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2001 Dec;78(5):179-86. doi: 10.2535/ofaj1936.78.5_179. PMID: 11915360.

Tallquist MD, Soriano P. Cell autonomous requirement for PDGFRalpha in populations of cranial and cardiac neural crest cells. *Development.* 2003 Feb;130(3):507-18. doi: 10.1242/dev.00241. PMID: 12490557.

Tapadia, M. D., Cordero, D. R., & Helms, J. A. (2005). It's all in your head: new insights into craniofacial development and deformation. *Journal of anatomy*, 207(5), 461–477. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00484.x>

Trainor PA. Craniofacial birth defects: The role of neural crest cells in the etiology and pathogenesis of Treacher Collins syndrome and the potential for prevention. *Am J Med Genet A.* 2010 Dec;152A(12):2984-94. doi: 10.1002/ajmg.a.33454. Epub 2010 Aug 23. PMID: 20734335; PMCID: PMC3686507.

Trompouki E, Bowman TV, Lawton LN, Fan ZP, Wu DC, DiBiase A, Martin CS, Cech JN, Sessa AK, Leblanc JL, Li P, Durand EM, Mosimann C, Heffner GC, Daley GQ, Paulson RF, Young RA, Zon LI. Lineage regulators direct BMP and Wnt pathways to cell-specific programs during differentiation and regeneration. *Cell.* 2011 Oct

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

28;147(3):577-89. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.044. PMID: 22036566; PMCID: PMC3219441.

Tsybovsky Y, Molday RS, Palczewski K. The ATP-binding cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease. *Adv Exp Med Biol.* 2010;703:105-25. doi: 10.1007/978-1-4419-5635-4_8. PMID: 20711710; PMCID: PMC2930353.

Twigg SR, Wilkie AO. New insights into craniofacial malformations. *Hum Mol Genet.* 2015 Oct 15;24(R1):R50-9. doi: 10.1093/hmg/ddv228. Epub 2015 Jun 17. PMID: 26085576; PMCID: PMC4571997.

Uchikawa M, Ishida Y, Takemoto T, Kamachi Y, Kondoh H. Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev Cell.* 2003 Apr;4(4):509-19. doi: 10.1016/s1534-5807(03)00088-1. PMID: 12689590.

Vanderas AP. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft Palate J.* 1987 Jul;24(3):216-25. PMID: 3308178.

Visel A, Blow MJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Chen F, Afzal V, Ren B, Rubin EM, Pennacchio LA. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature.* 2009 Feb 12;457(7231):854-8. doi: 10.1038/nature07730. PMID: 19212405; PMCID: PMC2745234.

Wang Q, Kurosaka H, Kikuchi M, Nakaya A, Trainor PA, Yamashiro T. Perturbed development of cranial neural crest cells in association with reduced sonic hedgehog signaling underlies the pathogenesis of retinoic-acid-induced cleft palate. *Dis Model Mech.* 2019 Oct 4;12(10):dmm040279. doi: 10.1242/dmm.040279. PMID: 31591086; PMCID: PMC6826016.

Wassenegger M. The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell.* 2005 Jul 15;122(1):13-6. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.034. PMID: 16009128.

Wehby GL, Cassell CH. The impact of orofacial clefts on quality of life and healthcare use and costs. *Oral Dis.* 2010 Jan;16(1):3-10. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01588.x. Epub 2009 Jul 27. PMID: 19656316; PMCID: PMC2905869.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Weinberg SM, Brandon CA, McHenry TH, Neiswanger K, Deleyiannis FW, de Salamanca JE, Castilla EE, Czeizel AE, Vieira AR, Marazita ML. Rethinking isolated cleft palate: evidence of occult lip defects in a subset of cases. *Am J Med Genet A*. 2008 Jul 1;146A(13):1670-5. doi: 10.1002/ajmg.a.32291. PMID: 18536047.

White JD, Indencleef K, Naqvi S, Eller RJ, Hoskens H, Roosenboom J, Lee MK, Li J, Mohammed J, Richmond S, Quillen EE, Norton HL, Feingold E, Swigut T, Marazita ML, Peeters H, Hens G, Shaffer JR, Wysocka J, Walsh S, Weinberg SM, Shriver MD, Claes P. Insights into the genetic architecture of the human face. *Nat Genet*. 2021 Jan;53(1):45-53. doi: 10.1038/s41588-020-00741-7. Epub 2020 Dec 7. PMID: 33288918; PMCID: PMC7796995.

Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD, Hayward RD, David DJ, Pulleyn LJ, Rutland P, et al. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet*. 1995 Feb;9(2):165-72. doi: 10.1038/ng0295-165. PMID: 7719344.

Williamson I, Hill RE, Bickmore WA. Enhancers: from developmental genetics to the genetics of common human disease. *Dev Cell*. 2011 Jul 19;21(1):17-9. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.008. PMID: 21763601.

Wilson NR, Olm-Shipman AJ, Acevedo DS, Palaniyandi K, Hall EG, Kosa E, Stumpff KM, Smith GJ, Pitstick L, Liao EC, Bjork BC, Czirok A, Saadi I. SPECC1L deficiency results in increased adherens junction stability and reduced cranial neural crest cell delamination. *Sci Rep*. 2016 Jan 20;6:17735. doi: 10.1038/srep17735. PMID: 26787558; PMCID: PMC4726231.

Wittkopp PJ, Kalay G. Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nat Rev Genet*. 2011 Dec 6;13(1):59-69. doi: 10.1038/nrg3095. PMID: 22143240.

Worley ML, Patel KG, Kilpatrick LA. Cleft Lip and Palate. *Clin Perinatol*. 2018 Dec;45(4):661-678. doi: 10.1016/j.clp.2018.07.006. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30396411.

Wray GA. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nat Rev Genet*. 2007 Mar;8(3):206-16. doi: 10.1038/nrg2063. PMID: 17304246.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Yang Y, Yuan J, Yao X, Zhang R, Yang H, Zhao R, Guo J, Jin K, Mei H, Luo Y, Zhao L, Tu M, Zhu Y. BMPR1B mutation causes Pierre Robin sequence. *Oncotarget*. 2017 Apr 18;8(16):25864-25871. doi: 10.18632/oncotarget.16531. PMID: 28418932; PMCID: PMC5432222.

Yildirim M, Seymen F, Deeley K, Cooper ME, Vieira AR. Defining predictors of cleft lip and palate risk. *J Dent Res*. 2012 Jun;91(6):556-61. doi: 10.1177/0022034512444928. Epub 2012 Apr 10. PMID: 22496123.

Yu L, Gu S, Alappat S, Song Y, Yan M, Zhang X, Zhang G, Jiang Y, Zhang Z, Zhang Y, Chen Y. Shox2-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate. *Development*. 2005 Oct;132(19):4397-406. doi: 10.1242/dev.02013. Epub 2005 Sep 1. PMID: 16141225.

Yu W, Serrano M, Miguel SS, Ruest LB, Svoboda KK. Cleft lip and palate genetics and application in early embryological development. *Indian J Plast Surg*. 2009 Oct;42 Suppl(Suppl):S35-50. doi: 10.4103/0970-0358.57185. PMID: 19884679; PMCID: PMC2825058.

Zalc A, Sinha R, Gulati GS, Wesche DJ, Daszczuk P, Swigut T, Weissman IL, Wysocka J. Reactivation of the pluripotency program precedes formation of the cranial neural crest. *Science*. 2021 Feb 5;371(6529):eabb4776. doi: 10.1126/science.abb4776. PMID: 33542111; PMCID: PMC8557957.

Zeitlinger J, Zinzen RP, Stark A, Kellis M, Zhang H, Young RA, Levine M. Whole-genome ChIP-chip analysis of Dorsal, Twist, and Snail suggests integration of diverse patterning processes in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev*. 2007 Feb 15;21(4):385-90. doi: 10.1101/gad.1509607. PMID: 17322397; PMCID: PMC1804326.

Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y. Rescue of cleft palate in *Msx1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development*. 2002 Sep;129(17):4135-46. PMID: 12163415.

Zhu JL, Basso O, Hasle H, Winther JF, Olsen JH, Olsen J. Do parents of children with congenital malformations have a higher cancer risk? A nationwide study in Denmark.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International ommittee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Br J Cancer. 2002 Aug 27;87(5):524-8. doi: 10.1038/sj.bjc.6600488. PMID: 12189550; PMCID: PMC2376161.

Zhu, H., & Zhou, X. (2020). Statistical methods for SNP heritability estimation and partition: A review. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 1557–1568. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.011>

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International ommittee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

ANEXOS

Anexo 1- Verificação de originalidade e prevenção de plágio

TESE			
RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE			
16% 	12%	13%	6%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS
FONTES PRIMÁRIAS			
1	pericles.pericles-prod.literatumonline.com Fonte da Internet	4%	
2	onlinelibrary.wiley.com Fonte da Internet	2%	
3	www.ncbi.nlm.nih.gov Fonte da Internet	2%	
4	Yu Ji, Michael A. Garland, Bo Sun, Shuwen Zhang et al. "Cellular and developmental basis of orofacial clefts", Birth Defects Research, 2020 Publicação	2%	
5	www.scribd.com Fonte da Internet	1%	
6	coek.info Fonte da Internet	1%	
7	Submitted to South Bank University Documento do Aluno	<1%	
8	Buecker, C.. "Enhancers as information integration hubs in development: lessons	<1%	

Anexo 2- Variantes associadas a fissuras labiais e o palatinas.xlsx

Anexo 3- Variantes com marcação em ChIP-seq e ATAC-seq para enhancer de CCN.xlsx

Anexo 4- IMAGENS DO GENOME BROWSER

