



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



**SIBELE NASCIMENTO DE AQUINO**  
Cirurgiã-Dentista

**AVALIAÇÃO DE NOVOS POLIMORFISMOS NOS GENES *TGF $\beta$ 3*, *MSX1*, *MYH9*  
e *JAG2* EM PACIENTES COM FISSURAS LÁBIO-PALATINAS NÃO-  
SINDRÔMICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia na Área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior

**PIRACICABA**  
**2011**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA**  
**BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

Aq56a Aquino, Sibeles Nascimento de.  
Avaliação de novos polimorfismos nos genes TGFB3, MSX1, MYH9 e JAG2 em pacientes com fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas / Sibeles Nascimento de Aquino. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Hercílio Martelli Júnior.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Anormalidades craniofaciais. 2. Frequência do gene. 3. Heterogeneidade genética. I. Martelli Júnior, Hercílio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

Título em Inglês: Evaluation of novel polymorphisms in genes TGFB3, MSX1, MYH9 and JAG2 in non syndromic cleft lip and palate

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Craniofacial abnormalities. 2. Gene frequency. 3. Genetic heterogeneity

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Hercílio Martelli Júnior, Ricardo Alves de Mesquita, Pablo Agustin Vargas

Data da Defesa: 17-02-2011

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



**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 17 de Fevereiro de 2011, considerou a candidata SIBELE NASCIMENTO DE AQUINO aprovada.



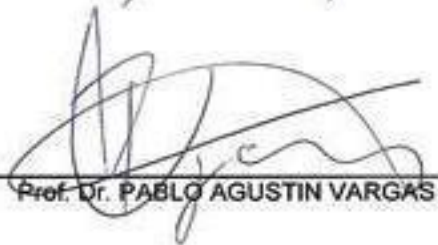
---

Prof. Dr. HERCÍLIO MARTELLI JUNIOR



---

Prof. Dr. RICARDO ALVES DE MESQUITA



---

Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS

## **DEDICATÓRIA**

---

---

A **Jandira**, meu maior tesouro, por tornar a minha vida mais suave e pelo exemplo de amor e dedicação maternos.

A **Epaminondas**, guerreiro e amado pai, exemplo de força e capacidade de construção.

A **Roney, Silene e Elias**, meus grandes amores, pela cumplicidade ímpar, por todas as ideias, dificuldades e alegrias compartilhadas, mesmo que distantes fisicamente.

A **José Maria e Aldenora**, pelo carinho e apoio algumas vezes paternais .

A **Elias**, minha eterna gratidão, que compreendeu sem questionar e esteve amorosamente presente.

Ao meu orientador, **prof. Dr. Hercílio Martelli-Júnior**, importante na minha formação pessoal e profissional, pelo incentivo aos trabalhos científicos desde a graduação, pelo exemplo de seriedade, persistência e bondade em tudo que se envolve. Registro aqui minha profunda admiração pela sua capacidade de construir novos caminhos e por me ensinar principalmente pelo exemplo.

## **AGRADECIMENTOS**

---

---

A **Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas**, na pessoa do seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**;

Ao professor, **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta** coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp;

Aos professores **Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta, Márcio Adjudarte Lopes, Pablo Agustin Vargas, Jacks Jorge Júnior**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp pelos momentos dedicados ao ensino.

A **CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao **prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, pela disponibilidade no laboratório, pela excelência ao conduzir a pesquisa e estimular a busca por conhecimento.

A **Universidade José do Rosário Vellano – Unifenas**, Alfenas, Minas Gerais, na pessoa do **prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts**, quem viabilizou esse trabalho conjunto com a Unicamp;

Ao **Centro Pró-Sorriso - Centrinho**, que tornou possível a realização desse trabalho; Aos **pacientes do Centrinho**, que participaram desta pesquisa; Aos companheiros de trabalho do Centrinho: **Julian, Letícia, Roseli, Elza, Didi**,

**Darley, Claudiney, Alfredo, Ruy, Denise e Cassandro** pela colaboração e convivência agradável;

A companheira de trabalho e amiga **Lívia Máris Ribeiro Paranaíba**, pelo acolhimento e treinamento no Centrinho e laboratório e por esclarecer as minhas frequentes dúvidas;

A turma do laboratório de Biologia Molecular: **Débora, Fabiana, Carol Bitu, Michelle Agostini, Lays, Marco Antônio, Rose e Manoela** pelos momentos de trabalho compartilhados e por estarem sempre dispostos a dividir o que sabem; A **Andréia Bufalino**, que não mediu esforços para me ajudar sempre e que, em certos momentos, foi um verdadeiro salva-vidas para mim;

Aos colegas da Patologia: **Adrielle, Allan, Carol Ribeiro, Fernanda, Jorge, Mário, Patrícia, Bruno, Renato, Victor, Marco Aurélio, Wilfredo, Ana Lúcia, Rogério**, pelo conhecimento compartilhado; A **Katya Pulido**, pelo grande auxílio prestado;

Ao biólogo **Adriano Luís Martíns**, pela colaboração e ensinamentos nos laboratórios de Patologia e Microscopia;

As minhas eternas amigas: **Maria Inês Ferreira, Jamille Juliene Alves do Espírito Santo, Izabel Karolynne Oliveira Rodrigues e Alessandra Teixeira Aguiar** por estarem, de alguma maneira, sempre presentes e pelos momentos maravilhosos que passamos juntas na graduação.

*A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho, meu profundo agradecimento.*

***“Em tempos de tristeza e de inquietação, não abandones nem as boas obras de oração, nem a penitência a que estás habituada. Antes, intensifica-as. E verás com que prontidão o Senhor te sustentará”.***

Santa Teresa de Ávila



## **RESUMO**

---

---

Fissuras do lábio e/ou palato (FL/P) representam uma das anomalias congênitas mais comuns em humanos. A etiologia das FL/PNS é complexa e envolve a participação de inúmeros genes e fatores ambientais. Diversos estudos têm investigado genes relacionados a síndromes, que apresentam FL/P em seu espectro clínico, e/ou que são expressos durante o desenvolvimento do lábio e/ou palato. O objetivo deste estudo foi verificar se novos polimorfismos contidos nos genes relacionados ao desenvolvimento do lábio e palato, incluindo *TGFβ3*, *MSX1*, *MYH9* e *JAG2*, podem contribuir para a etiologia das FL/PNS. Seis regiões polimórficas foram genotipadas por PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase associada à análise de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática) em amostras de DNA proveniente de 367 pacientes com FL/PNS (grupo caso) e de 413 indivíduos não afetados (grupo controle). No grupo caso, 54% foram do gênero masculino e 46% do feminino, com idade média de  $19,1 \pm 14,9$  anos e prevalência de indivíduos feodermas (42,5%) e leucodermas (42%). As fissuras lábio-palatinas (FLP) foram predominantes (54%), seguidas pela fissura labial (FL) (24%) e fissura palatina (FP) (22%). Do total de seis polimorfismos analisados neste estudo, apenas um foi confirmado nessa população: rs1057744 do gene *JAG2*. Para este locus polimórfico, o alelo A e o genótipo GA foi mais comum, no grupo controle e caso, não sendo encontrada diferença estatística significativa. Para esse polimorfismo, a análise em um modo dominante ou recessivo também não mostrou diferenças estatísticas significantes. Assim, demonstrou-se que os polimorfismos rs34019007 e rs4252315, do gene *TGFβ3*, rs62636562, do gene *MSX1*, rs11549910 e rs11549909, do gene *MYH9* não foram confirmados. O polimorfismo rs1057744 do gene *JAG2*, embora confirmado, não apresentou associação significativa com FL/PNS na população avaliada.

Palavras chave: Anormalidade Craniofacial, Frequência do Gene, Heterogeneidade Genética.

## ***ABSTRACT***

---

---

Cleft lip and/or cleft palate (CL/P) is one of the most common congenital anomaly in humans. NSCL/P etiology is complex and involves the participation of numerous genes and environmental factors. Several studies have investigated genes related to syndromes that have CL/P in their clinical and/or which are expressed during the development of lip and palate. The aim of this study was to determine whether polymorphisms contained genes related to the development of lip and/or palate, including *TGF $\beta$ 3*, *MSX1*, *MYH9* and *JAG2* can contribute to the etiology of NSCL/P. Six polymorphic regions were genotyped by PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction) in DNA samples from 367 patients affected by NSCL/P (experimental group) and 413 clinically normal subjects (control group). In the affected group, 54% were male and 46% female, mean age  $19.1 \pm 14.9$  years and the prevalence of mixed black individuals (42.5%) and Caucasian (42%). The clefts of the lip with or without cleft palate (CLP) were predominant (54%), followed by cleft lip (FL) (24%) and cleft palate FP (22%). Out of 6 probable polymorphisms, only one was confirmed in this population: rs1057744 gene *JAG2*. For this polymorphic locus, the A allele and the genotype was slightly more common in the control and experimental, without statistically significant differences. For this polymorphism, the analysis in a dominant or recessive mode also showed no statistically significant differences between the groups. This study demonstrated that the polymorphisms rs34019007 and rs4252315, present in the gene *TGF $\beta$ 3*, rs62636562, in the *MSX1* gene, rs11549910 and rs11549909, in the *MYH9* gene were not confirmed. The rs1057744 polymorphism in *JAG2* gene was confirmed in this study but not significantly associated with NSCL/P in the Brazilian population.

Key words: Craniofacial Abnormalities, Gene Frequency, Genetic Heterogeneity.

## **LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS**

---

---

°C – Grau Celsius

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucléico)

dNTPs: *Deoxynucleoside 5' triphosphate* (Desoxinucleotídeo trifosfato)

dTMP: Deoxitimidina monofosfato

dUMP: Deoxiuridina monofosfato

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

EEC: *Ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and cleft lip/palate syndrome* (Síndrome da ectrodactilia, displasia ectodérmica e fissura lábio-palatina)

FGF: *Factor growth fibroblast* (gene do fator de crescimento do fibroblasto)

FL/P: Fissura labial e/ou palatina

FL: Fissura labial

FLP: Fissura labial e palatina

FOXE1: *Forkhead box E1* (gene da família de fatores de transcrição tireoidianos)

FOP – Faculdade de Odontologia de Piracicaba

FP: Fissura palatina

GST: *Glutathione s-transferase* (gene da glutathione s-transferase)

IRF6: *Interferon regulatory factor 6* (gene fator regulador de interferon 6)

JAG2: *Jagged 2* (gene dos ligantes de superfície celular para receptores transmembrânicos)

LHX8: *Lim homeobox gene 8* (gene 8 da família *homeobox Lim*)

ug – Microgramas

ml – Mililitros

mM – Milimolar

MID1: *Midline 1* (gene relacionado com diferenciação e proliferação celular)

MSX: *Muscle Segment Homeobox* (gene da *homeobox* do segmento muscular)

MTHFD1: *Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1* (Metileno-tetraidrofolato desidrogenase 1)

*MTHFR*: 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (5,10-metilenotetraidrofolato redutase)

*MTR*: 5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase (5 metiltetraidrofolato-homocisteína S-metiltransferase)

*MYH9*: Myosin, heavy chain 9, nonmuscle (gene da cadeia pesada da miosina não relacionada especificamente com tecidos musculares)

*NAT*: N-acetyltransferase (N-acetiltransferase)

nM – Nanomolar

nm – Nanômetro

*OD*: Optical density (Densidade óptica)

*PCR*: Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

*PCR-RFLP*: PCR-Reaction fragment length polymorphism (PCR associada à análise de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática)

*PVRL*: Poliovirus receptor-like gene (gene do receptor-like de poliovírus)

*RARA*: Retinoic acid receptor (Receptor de ácido retinóico)

SNP – Single nucleotide polymorphism – Polimorfismo de nucleotídeo único

*SPRY2*: Sprouty, Drosophila, Homolog of 2 (homólogo humano do gene *sprout 2* da drosófila)

*SUMO*: Small ubiquitin-like modifier 1 (modificador 1 de pequena proteínas ubiquitina-Like)

SVW: Síndrome de Van der Woude

*TBE*: Tris Borate EDTA buffer (tampão Tris, ácido bórico e EDTA)

*TBX*: T-box transcription factor (fator de Transcrição T-box )

*TGF $\alpha$* : Transforming Growth Factor  $\alpha$  (fator de Crescimento Transformante Alfa)

*TGF $\beta$* : Transforming Growth Factor  $\beta$  (fator de Crescimento Transformante Beta)

*TP63*: Tumor protein p63 (gene que codifica para a proteína tumoral p63 homólogo da p53)

U – Unidade

Unicamp - Universidade Estadual de Campinas

## **SUMÁRIO**

---

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	04
2.1. Fissura Labial e/ou Palatina Não-Sindrômica	04
2.2. Dados Epidemiológicos	07
2.3. Embriologia	09
2.4. Etiologia	11
2.4.1. Fatores Ambientais	14
2.4.2. Fatores Genéticos	17
<b>3. OBJETIVOS</b>	30
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos Específicos	30
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	31
4.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	31
4.2. População	31
4.3. Seleção dos Genes Candidatos e dos Polimorfismos Gênicos	32
4.4. Coleta das Amostras para Análise de Polimorfismos	33
4.5. Isolamento do DNA	33
4.6. PRC-RFLP (Reação em cadeia da polimerase associada à análise de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática)	34
4.7. Análise estatística	36
<b>5. RESULTADOS</b>	37
5.1 Características Gerais dos Grupos	37
5.2. Frequência Alélica e Genotípica dos Polimorfismos	38
5.2.1. Polimorfismo rs1057744	40
<b>6. DISCUSSÃO</b>	43
<b>7. CONCLUSÕES</b>	52
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	53
<b>9. ANEXO</b>	
<b>9.1. ANEXO 1: Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos</b>	78

## 1. INTRODUÇÃO

---

---

Fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) estão entre as alterações congênitas mais frequentes nos seres humanos e representam as malformações mais comuns na região craniofacial (Stanier & Moore, 2004; Forrest & Merz, 2004). Aproximadamente 70% dos casos de FL/P ocorrem de forma não-sindrômica (FL/PNS), isolada, ou seja, sem malformações ou alterações adicionais, e os demais 30% referem-se às associações, em que são observadas desordens mendelianas (autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao X), cromossômicas, teratogênicas e condições esporádicas que incluem defeitos congênitos (Nopoulos *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2009). Mais de 400 síndromes já descritas apresentam FL/P no seu espectro clínico (Scapoli *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009). As FL/P representam uma importante condição na saúde pública mundial uma vez que requerem um complexo tratamento multidisciplinar que envolve apoio médico, psicológico, fonoaudiológico, nutricional e odontológico por um longo período (Christensen *et al.*, 2004). Tem sido sugerido ainda que crianças com FL/P possuem risco aumentado para o desenvolvimento de câncer na vida adulta (Zhu *et al.*, 2002) e alterações psiquiátricas (Christensen & Mortensen, 2002).

As FL/P podem ser classificadas clinicamente, tendo como referência anatômica o forame incisivo, em: (1) fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais (FL); (2) fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP); (3) fissuras transforame incisivo ou fissuras lábio-palatinas (FLP) e (4) fissuras raras da face (Spina *et al.*, 1972). Considerando o tipo de fissura, há alguns estudos que observaram uma maior ocorrência de FLP (Rajabian & Sherkat, 2000; Cooper *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2004; Martelli-Júnior *et al.*, 2006). No entanto, outros trabalhos mostram que as FP (Bellis & Wohlgemuth, 1999; Stoll *et al.*, 2000) ou as FL (Nagem *et al.*, 1968) isoladas podem apresentar frequência superior a das FLP.

A incidência das FL/PNS é de aproximadamente 1 em cada 500-2.000 nascidos vivos e varia de acordo com a localização geográfica, etnia/raça e

condição sócio-econômica da população estudada (Slayton *et al.*, 2003; Lidral *et al.*, 2008). Na América Latina, estudo realizado por Vieira e colaboradores (2003) encontrou uma incidência aproximada de 1,1 casos de FL/PNS para cada 1.000 crianças nativas. Os levantamentos realizados no Brasil são escassos e mostram uma incidência de FL/PNS variando de 0,19 a 1,54 para cada 1.000 nascimentos (Loffredo *et al.*, 2001; Martelli-Júnior *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2009). Não se sabe se esta diferença epidemiológica é real ou associada a diferenças metodológicas.

Embriologicamente, as FL/P são resultantes de defeitos na fusão dos processos craniofaciais que formam o palato primário e secundário, no primeiro trimestre do desenvolvimento intra-uterino (Carinci *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2009). Mesmo representando uma alteração do desenvolvimento comum, a etiopatogenia das FL/PNS ainda é pouco compreendida, provavelmente reflexo da vasta diversidade dos mecanismos moleculares envolvidos na embriogênese facial. Entretanto, há um consenso de que se trate de uma condição multifatorial, com a participação de cerca de 3 a 14 genes e da influência de fatores ambientais (Krost & Schubert, 2006; Vieira *et al.*, 2008; Letra *et al.*, 2010). Dentre os principais fatores ambientais estudados até o momento, estão o consumo de bebidas alcoólicas e tabagismo durante a gestação (Vieira, 2008b; Zarante *et al.*, 2009; Leite & Koifman, 2009; Jia *et al.*, 2009), idade materna avançada (Vieira *et al.*, 2002b; Materna-Kirylyuk *et al.*, 2009), consanguinidade (Leite & Koifman, 2009; Aquino *et al.*, 2011), uso de medicamentos durante a gestação (Zarante *et al.*, 2009), presença de doenças sistêmicas (Puho *et al.*, 2007), desnutrição materna e avitaminose, particularmente durante o primeiro trimestre de gestação (Johnson & Little, 2008).

Alguns estudos sobre a etiopatogenia das FL/PNS buscam determinar o papel das variantes polimórficas dos genes associados às vias de sinalização celular que participam da formação do lábio e/ou palato, bem como o papel dos fatores ambientais na modulação da expressão e função destes genes (Chevrier *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2008b; Carroll *et al.*, 2009; Letra *et al.*, 2010). Nos últimos

anos foram identificados genes que quando mutados resultam em síndromes que contém a FL/P em seu cenário clínico, abrindo a perspectiva de que polimorfismos nestes genes possam também contribuir para a etiologia das FL/PNS (Scapoli *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2009).

Além dos genes implicados na etiologia de síndromes, são associados às FL/PNS diferentes genes relacionados à formação craniofacial, como *TGF- $\beta$ 3* (*Transforming growth factor beta 3*) (Vieira *et al.*, 2003) *MSX1* (*Msh homeobox 1*) (Carinci *et al.*, 2007), *IRF6* (*Interferon regulatory factor 6*), (Paranaíba *et al.*, 2009) *FGFs* (*Fibroblast growth factor*) (Riley *et al.*, 2007), *MYH9* (*myosin, heavy chain 9, non-muscle*) (Martinelli *et al.*, 2007), *FOXE1* (*forkhead box E1*), *JAG2* (*Jagged 2*) (Vieira *et al.*, 2005) e *TBX22* (*T-box 22*) (Braybrook *et al.*, 2001).

No presente estudo, investigou-se a distribuição alélica e genotípica de variantes polimórficas nos genes *TGF $\beta$ 3*, *MSX1*, *MYH9* e *JAG2* entre indivíduos com e sem FL/PNS.



## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

---

---

### **2.1. Fissura Labial e/ou Palatina Não-Sindrômica**

As FL/P são anomalias congênitas caracterizadas por regiões de descontinuidade no lábio e/ou palato, devido a falhas na fusão dos processos faciais embrionários (Murray & Schutte, 2004; Dudas *et al.*, 2007). As FL/P são divididas, baseando-se na região de envolvimento anatômico, em 4 grupos: fissuras pré-forame incisivo ou, simplesmente, fissuras labiais (FL), fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP), que envolvem o palato mole e/ou duro, fissuras trans-forame incisivo ou fissuras lábio-palatinas (FLP), que envolvem lábio e palato mole/duro e fissuras raras da face (Spina *et al.*, 1972; Gorlin *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2008). A FL surge quando fracassa a fusão das proeminências nasais e maxilares e a FP quando há falta de fusão das prateleiras palatinas, sendo que pacientes que exibem falhas nos dois processos possuem FLP (Carinci *et al.*, 2007). Embora alguns trabalhos avaliem FL e FLP sem distingui-las, há estudos sugerindo que essas duas categorias podem ter diferentes causas genéticas e por isso devem ser analisadas separadamente sempre que possível (Harville *et al.*, 2005; Jugessur *et al.*, 2008).

Uma sequência de eventos de alta complexidade, coordenados pela interação entre fatores de transcrição e sinalizadores moleculares juntamente com interações célula-célula e aquisição de polarização celular, é essencial para o desenvolvimento normal da face durante a embriogênese (Stanier & Moore, 2004). Em razão desta alta complexidade, as FL/P representam uma importante fração de todos os defeitos congênitos em humanos. As FL/P podem surgir como característica fenotípica de mais de 400 síndromes já identificadas (Gorlin *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2008). Anomalias citogenéticas (Trissomia do 13 e 18, 4p-), distúrbios monogênicos (síndrome de Van der Woude, síndrome de Stickler) são exemplos de condições associadas às FL/P (Marazita *et al.*, 2002). Quando

surtem sem outras características adicionais, a denominação FL/P não-sindrômicas (FL/PNS) tem sido utilizada.

Tem sido demonstrado que avaliar as FL/PNS apenas sob o aspecto da malformação craniofacial é uma estimativa aquém das reais consequências dessa condição. Os indivíduos afetados apresentam menor vida útil, com risco aumentado para todas as causas principais de morte, quando comparado com indivíduos que não são afetados (Christensen *et al.*, 2004). Para o indivíduo afetado, há ainda significativa morbidade ao longo da vida uma vez que efeitos sobre a fala, audição, aparência e cognição geram resultados adversos sobre a saúde e integração social (Mossey *et al.*, 2009).

Os déficits cognitivos em fissuras sindrômicas são frequentes e muitas vezes graves. Nos casos de FL/PNS, esses déficits são menos acentuados, mas podem ser de 6 a 10 vezes mais prevalentes em crianças com fissuras, quando comparado com a população em geral (Broder *et al.*, 1998). A etiologia dos déficits cognitivos tem sido mais comumente citada como decorrência de fatores secundários, tais como audição (otite média crônica, que é muito comum nesta população) e/ou déficit na fala (Sak & Ruben, 1982). Entretanto, há estudos que apontam um aumento na frequência de anomalias estruturais no cérebro, incluindo diminuição do volume cerebral e cerebelar e alterações na trajetória do desenvolvimento do cérebro, em associação às FL/PNS (Nopoulos *et al.*, 2007; Vieira, 2008). Interessantemente, os desenvolvimentos do cérebro e face estão intimamente relacionados e o desenvolvimento anormal do cérebro pode acompanhar uma anormalidade no desenvolvimento facial (Nopoulos *et al.*, 2007). Em adição, Christensen & Mortensen (2002) demonstraram que pacientes fissurados apresentam um risco aumentado de hospitalização por distúrbios psiquiátricos.

A associação entre FL/PNS e câncer infantil tem sido controversa (Steinwachs *et al.*, 2000; Nishi *et al.*, 2000). No entanto, indivíduos adultos com FL/PNS apresentam risco aumentado para ocorrência de câncer de mama e cérebro em mulheres e de neoplasia primária de pulmão entre homens (Bille *et al.*,

2005). Um estudo mostrou ainda que pais de crianças com FL/PNS apresentam risco elevado para o desenvolvimento de cânceres, particularmente linfomas e leucemias (Zhu *et al.*, 2002). Tem sido sugerido que as neoplasias malignas e FL/P possuem variações em comum nos genes que regulam o crescimento e desenvolvimento tecidual (Narod *et al.*, 1997; Nishi *et al.*, 2000; Taioli *et al.*, 2010). Os genes que foram suspeitos de estarem na base desta associação são a via de sinalização de fibroblastos (*FGF*), caderina epitelial (*CDH1*) e eixo de inibição da proteína 2 (*AXIN2*). Os tipos de cânceres mais frequentemente associado com mutações nos genes acima mencionados são cânceres do cólon-reto e mama. Suportando esta hipótese, destaca-se a identificação de mutações em caderina (*CDH1*), uma molécula de adesão celular expressa por células epiteliais, em 2 famílias segregando membros com câncer gástrico difuso e FL/PNS (Freboung *et al.*, 2006). Além disso, Menezes e colaboradores (2009) identificaram que o gene *AXIN2*, um dos genes associados às FL/PNS, quando mutado aumenta a susceptibilidade para câncer de cólon.

Os sujeitos com FL/P necessitam de cuidados multidisciplinares do nascimento até a vida adulta (Christensen *et al.*, 2004; Ngai *et al.*, 2005). Embora a reabilitação seja possível com o atendimento de boa qualidade, as FL/P, inevitavelmente, constituem um ônus para o indivíduo, a família e a sociedade, com um custo substancial em termos de saúde e serviços relacionados. As crianças nascidas com essa anomalia precisam de cuidados de enfermagem, cirurgia plástica, cirurgia bucomaxilofacial, otorrinolaringologia, fonoaudiologia, aconselhamento, psicologia, genética e odontologia. Entretanto, esse conjunto de disciplinas tende a fornecer uma atenção fragmentada, o que gera controvérsias sobre o tratamento e acompanhamento desses pacientes (WHO, 2002; Mossey *et al.*, 2009). Um protocolo padrão para o atendimento e reabilitação dos pacientes com FL/P é motivo de preocupação em países desenvolvidos e subdesenvolvidos por conta da ausência de sistematização entre os serviços especializados (WHO, 2002; Paranaíba *et al.*, 2009).

## 2.2. Dados Epidemiológicos

A frequência de FL/PNS é desconhecida em algumas partes do mundo. Em muitas regiões, nas quais existem informações disponíveis, as diferenças na origem da amostra (hospital ou população), duração, método de apuração e os critérios de inclusão restringem comparações (Mossey & Little, 2002). Os estudos disponíveis indicam que a malformação afeta aproximadamente 1 em cada 500 a 2.000 nascidos vivos, dependendo da origem geográfica, da etnicidade, do gênero e do padrão sócio-econômico da população estudada (Gorlin *et al.*, 2001; Mossey & Little, 2002; Murthy & Bhaskar, 2009). Considerando-se as diferentes etnias, a prevalência das FL/PNS é menor entre africanos e descendentes de africanos, intermediária entre os caucasianos e alta entre as populações de ameríndios e asiáticos (Vieira *et al.*, 2002; Mossey & Little, 2002; Vieira *et al.*, 2008c). A prevalência em latino-americanos é menor que entre americanos caucasianos, mas ainda é superior à prevalência em afro-americanos (Murthy & Bhaskar, 2009).

Os diferentes tipos de fissura apresentaram distribuição distinta e a incidência varia entre os diferentes grupos populacionais (Mossey & Little, 2002; Mossey *et al.*, 2009). A frequência de FLP foi maior em algumas regiões da América Latina e Ásia (China, Japão) e menor em Israel, África do Sul e sul da Europa (Mossey & Little, 2002). A FP isolada apresentou frequência elevada no Canadá e em partes do norte europeu, porém menores em algumas regiões da América Latina e África do Sul (Mossey & Little, 2002). Comparações entre os grupos étnicos nos Estados Unidos (Croen *et al.*, 1998) e no Reino Unido (Leck & Lancashire, 1998) e estudos de imigrantes do Japão e da China para os EUA (Croen *et al.*, 1998) indicaram que os grupos migrantes possuem prevalência de FLP mais próxima a do país de origem.

Alguns estudos mostram uma maior incidência de FLP seguida pela FL e FP (Cooper *et al.*, 2000; Martelli-Júnior *et al.*, 2006; Gregg *et al.*, 2008) e maior frequência no gênero masculino, numa proporção de dois homens para cada mulher (Wyszynski, 2002; Martelli-Júnior *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008). A proporção entre os gêneros parece variar com a gravidade da fissura, presença de

malformações adicionais, número de irmãos afetados na família, origem étnica e possivelmente idade dos pais (revisado por Mossey *et al.*, 2002). A FLP é mais frequente no gênero masculino e FP isolada é mais comum em mulheres, em vários grupos étnicos. FP apresenta uma relação de 0,73:1 entre homens e mulheres caucasianos (Murthy & Bhaskar, 2009). Considerando a lateralidade, as fissuras unilaterais são mais comuns que as bilaterais, sendo o lado esquerdo mais afetado (Stoll *et al.*, 1991; Lidral *et al.*, 2008; Murthy & Bhaskar, 2009).

Os estudos que analisaram a frequência das FL/PNS na população brasileira são escassos. Loffredo e colaboradores (2001) realizaram um estudo durante um período de 20 anos no Hospital para Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (Centrinho), Bauru-SP e revelaram uma prevalência de 0,19 casos de fissuras lábio-palatinas para cada 1.000 nascidos vivos. Estudo posterior realizado neste mesmo Centro encontrou uma maior frequência das FLP (37,1%) e predomínio do gênero masculino. Quanto ao tipo de fissura e gênero, houve uma maior frequência de mulheres entre as FP isoladas (Freitas *et al.*, 2004). Um estudo conduzido no município de Campos dos Goyatazes-RJ encontrou uma incidência de 1,35 casos de FL/PNS para cada 1.000 nativos (Nunes *et al.*, 2007). Em outro estudo, Rodrigues e colaboradores (2009) relataram 5.764 novos casos de fissuras lábio-palatinas em várias regiões do Brasil e encontraram uma prevalência estimada de 0,36/1.000 casos em um período de 5 anos, com uma proporção de 1,6 homens para cada mulher. Nosso grupo tem participado de estudos que analisaram a prevalência de FL/PNS no Centro para Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas, Alfenas - MG. No primeiro estudo concluído em 2006, levando em consideração o número de nascidos vivos com e sem FL/PNS na região Sul do Estado de Minas Gerais, observou-se prevalência de 1,46 casos de FL/PNS para cada 1.000 nativos, com uma maior frequência em crianças caucasianas do gênero masculino (Martelli-Júnior *et al.*, 2006). O segundo estudo observou maior frequência de FLP (39,68%), seguida por FL (38,09%) e pela FP (22,23%) nos casos avaliados (Martelli-Júnior *et al.*, 2007). Este estudo também demonstrou que

a relação entre homens e mulheres foi de 1,3, sendo os homens 2,57 vezes mais atingidos por FLP do que as mulheres. As FL unilaterais foram mais frequentes que as bilaterais (Martelli-Júnior *et al.*, 2007).

### **2.3. Embriologia**

A formação do lábio e palato envolve uma série complexa de eventos que exigem uma estreita relação entre migração celular, crescimento, diferenciação e apoptose, coordenados pela interação de fatores de transcrição e sinalizadores moleculares juntamente com interações intercelulares (Mossey *et al.*, 2002; Stanier & Moore, 2004; Mossey *et al.*, 2009). As regiões do lábio e do palato são desenvolvidas a partir do palato primário e secundário. O palato primário contribui para a formação do lábio e a porção pré-maxilar da maxila. O palato secundário é o primórdio das partes dura e mole do palato. As FL/P resultam de falhas nos eventos relacionados ao desenvolvimento dessas estruturas e se desenvolvem durante os estágios precoces da embriogênese, sendo as formações do lábio superior e do palato temporalmente diferentes (Mossey *et al.*, 2009).

O desenvolvimento da face humana inicia-se na quarta semana da embriogênese com a migração de células da crista neural, que combinadas com o núcleo da mesoderme e revestimento epitelial, estabelecem o primórdio facial. Por volta do 26º dia de gestação, a boca primitiva está cercada caudalmente por um par de processos mandibulares, lateralmente por um par de processos maxilares e rostralmente pelo desenvolvimento da proeminência frontonasal e cérebro (revisado por Jiang *et al.*, 2006).

Na 4ª a 5ª semana da embriogênese, as extremidades mediais dos processos mandibulares gradualmente se desenvolvem no sentido caudal-rostral para formar a mandíbula (Yoon *et al.*, 2000). Por volta de 32 dias de gestação, há um espessamento da ectoderme superficial bilateralmente na parte ventrolateral da proeminência frontonasal, dando origem aos placóides nasais. Em seguida, o processo frontonasal se desenvolve e origina as fossas nasais (Sperber *et al.*,

2002). Aproximadamente no 35º dia de gestação, o rápido crescimento mesenquimal dos processos maxilares empurra as fossas nasais medialmente, enquanto o processo nasal medial cresce ventrolateralmente. Nesta fase, o lábio superior consiste nos processos maxilar, nasal medial e nasal lateral. Subsequentemente há o início da fusão entre os processos nasal medial e lateral, seguida pela fusão com os processos maxilares. Na sétima semana, a formação do lábio superior é concluída quando as linhas de fusão entre os processos desaparecem (revisado por Jiang *et al.*, 2006).

O desenvolvimento do palato secundário envolve uma sequência de eventos no desenvolvimento embrionário. Na sexta semana de vida intra-uterina, núcleos de células mesenquimais (derivadas da crista neural), cercados por células epiteliais (derivadas do ectoderma), dão origem aos primórdios palatais, localizados nas bordas laterais dos processos maxilares. Em seguida, as duas prateleiras palatinas crescem verticalmente para baixo e ao longo dos dois lados da língua. Então, a mandíbula cresce em comprimento, a língua se desloca para uma posição mais inferior de modo que as prateleiras palatinas sejam elevadas acima do dorso da língua (Murray & Schutte, 2004; Meng *et al.*, 2009). Na 9ª semana de gestação, as prateleiras crescem uma em direção à outra e se reúnem na região mediana da orofaringe. Em seguida se aderem em sua borda epitelial medial, *MEE* (do inglês, *medial edge epithelia*) e desencadeiam uma série de reações celulares e bioquímicas, ainda bastante discutidas, que levam à fusão, dando origem a *MES* (do inglês, *midline edge seam*). Após a fusão, o mesênquima palatino se diferencia em elementos musculares e ósseos que correlacionam com a posição do palato mole e duro, respectivamente. Na décima semana da embriogênese, os processos fusionados provenientes dos palatos primário e secundário e do septo nasal estão completos (Murray & Schutte, 2004).

## 2.4. Etiologia

Mesmo representando um defeito congênito comum, a etiopatogenia das FL/PNS permanece incerta. Isto é, em grande parte, reflexo da complexidade e diversidade dos eventos moleculares envolvidos durante a embriogênese, sendo difícil determinar o exato momento e a razão precisa pela qual não houve coalescência dos processos que dão origem ao lábio e/ou palato (Vieira, 2008). Apesar das consideráveis controvérsias existentes na literatura sobre a etiologia das FL/P, é bem aceito que elas representam uma condição multifatorial, sendo resultado da associação de fatores genéticos e ambientais, embora ainda se conheça pouco sobre a exata participação de cada um dos fatores já descritos (Bliek *et al.*, 2009; Boyles *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009; Kistner *et al.*, 2009).

Comparado com outros defeitos congênitos, FL/P apresentam maior taxa de recorrência familiar (Lie *et al.*, 1994), embora um padrão clássico de herança mendeliana não seja facilmente identificado (Natsume *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2008c). Fogh-Andersen (1942) foi o primeiro a observar, em um estudo populacional, a existência de um componente hereditário associado ao desenvolvimento das FL/PNS. Em um estudo clássico, Curtis e colaboradores (1961) demonstraram que o risco de uma segunda ocorrência de FL/PNS em uma mesma família é de 4% se uma criança for afetada, 4% se os pais forem afetados, 9% se existirem duas crianças afetadas e 17% se os pais e uma criança forem afetados. Já um estudo norueguês, avaliando 4.138 crianças com FL/PNS, identificou que o risco de recorrência de fissura em familiares de primeiro grau foi de 32% para FL e 56% para FP, sugerindo uma base genética maior para FP comparada com FL (Sivertsen *et al.*, 2008). Um trabalho recente do nosso grupo, avaliando a incidência familiar de FL/PNS em 185 pacientes, identificou que 35,13% dos indivíduos apresentavam histórico familiar de FL/P, sendo os primos (54,37%) e os irmãos (21,05%) os mais afetados independentemente do tipo de fissura (Martelli *et al.*, 2010). Em estudos com gêmeos, a taxa de concordância observada de 40 a 60% em gêmeos monozigóticos é muito maior do que a concordância de 3 a 5% identificada em gêmeos dizigóticos, fornecendo



evidências para um componente genético forte para as FL/P, mas esses dados não descartam a participação de outros fatores, como os ambientais, na etiologia destas alterações (Jugessur *et al.*, 2009).

Famílias afetadas por um tipo de fissura não apresentam risco aumentado para um outro tipo de fissura, refletindo assim as origens distintas de desenvolvimento de cada forma da anomalia (Jugessur & Murray, 2005). No entanto, ocasionalmente FLP e FP isolada podem ocorrer dentro de uma mesma família, sugerindo que existe, pelo menos, alguma sobreposição na etiologia destes 2 tipos de fissuras. Tais situações são mais frequentes em síndromes com FL/P como parte do fenótipo, como a síndrome de Van der Woude (SVW, OMIM #119300) causada por mutações no gene do fator regulador de interferon 6 (*IRF6*) (Kondo *et al.*, 2002) e FL/P com hipodontia causada por mutações em *MSX1* (van den Boogaard *et al.*, 2000).

A relação entre anomalias congênitas e consanguinidade é observada em outros trabalhos (Kanaan *et al.*, 2008; Leite & Koifman, 2009). Um estudo que verificava a presença de anomalias congênitas em crianças provenientes de casamentos consanguíneos encontrou uma associação significativa entre consanguinidade de primeiro grau e anomalias congênitas como paralisia cerebral, fibrose cística, retardo no desenvolvimento, cegueira congênita e FL/PNS (Kanaan *et al.*, 2008). Estudo realizado na América Latina mostrou que 5.931 crianças, de um total de 32.845, eram provenientes de casamentos consanguíneos e apresentavam anomalias congênitas, incluindo as FL/PNS (Rittler *et al.*, 2001). Similarmente, estudos realizados por diferentes populações demonstraram uma significativa associação entre casamentos de parentes de primeiro grau e FL/PNS (Rajabian & Sherkat, 2000; Rittler *et al.*, 2001; Jamilian *et al.*, 2007). Um trabalho realizado pelo nosso grupo, avaliando 246 casos de FL/PNS quanto à consanguinidade, evidenciou que 6,1% dos casos apresentaram histórico de casamento entre parentes de primeiro grau (Aquino *et al.*, *in press*). Provavelmente, uma possível explicação para tal correlação seria uma predisposição genética como um componente recessivo associado à FL/P (Stoll *et*

*al.*, 1991). Contudo, esta mesma associação não foi observada em outros estudos retrospectivos (Calzolari *et al.*, 1988; González *et al.*, 2008).

Existem ainda estudos que avaliam a influência da sazonalidade na ocorrência de FL/PNS e consideram razoável esperar que as fissuras apresentem variações sazonais (Fraser & Gwyn, 1998; Elliot *et al.*, 2006). A relação entre meses de nascimento e FL/P seria consistente com variações em fatores ambientais, presentes em determinadas estações do ano, como dieta maternal deficiente em alguns nutrientes, particularmente ácido fólico, exposição à luz ultravioleta, ciclos de doenças infecciosas e exposição, durante a gestação, a fertilizantes e pesticidas utilizados na agricultura (Fraser & Gwyn, 1998; Elliot *et al.*, 2006; Krost & Schubert, 2006; González *et al.*, 2008). Um estudo realizado em Montreal observou um significativo aumento no nascimento de meninos com FLP em julho (Fraser & Gwyn, 1998), na África no período de março a agosto (Elliot *et al.*, 2006) e na China, no período de janeiro a julho (Cooper *et al.*, 2000). Entretanto, outros estudos não encontraram influência da sazonalidade em qualquer tipo de FL/P (Stoll *et al.*, 1991; Amidei *et al.*, 1994; Christensen, 1999).

A identificação de fatores de risco genéticos e ambientais para fissuras tem sido objeto de intensas pesquisas por várias décadas (Jugessur & Murray, 2005; Lidral & Moreno, 2005). Nos últimos anos, têm sido notados avanços consideráveis no mapeamento de locos, com a lista de genes candidatos em rápida expansão desde a primeira associação do gene *TGF $\alpha$*  (Ardinger *et al.*, 1989) para incluir agora *IRF6*, *MSX1*, *TGF $\beta$ 3*, *FOXE1*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGF8*, *PDGFC*, *CRISPLD2*, *PVRL1*, *GABRB3*, *MSX2*, *SATB2*, *TBX10*, *TBX22*, *GLI2*, *JAG2*, *MTHFR*, *RARA*, *LHX8* e *SPRY2*, entre outros (Ding *et al.*, 2004; Lidral & Murray, 2004; Marazita *et al.*, 2004; Jugessur & Murray, 2005; Lidral & Moreno, 2005; Vieira *et al.*, 2005; Chiquet *et al.*, 2007; Riley & Murray, 2007; Shi *et al.*, 2009).

Os resultados de mapeamento de muitos genes e estudos de associação de outros genes candidatos em potencial para desenvolvimento de FL/PNS são considerados inconclusivos ou não têm sido replicados em estudos diferentes

(Marazita & Neiswanger, 2002). Além das diferentes populações de cada estudo, uma razão para a relativa redução na força dos estudos pode estar relacionada ao fato de normalmente se utilizar apenas a presença de fissura como fenótipo. Trabalhos atuais têm mostrado uma avaliação ainda mais apurada e sugerido que esses indivíduos podem apresentar outras características subclínicas e gravidade variável das fissuras, o que poderia indicar a presença de diferentes genes e fatores ambientais envolvidos na etiologia de FL/P (Weinberg *et al.*, 2006; Neiswanger *et al.*, 2006). Da mesma forma, os membros da família podem ser portadores de alelos com susceptibilidade para fissura, mas que não são suficientes para elevá-los acima do limiar e conduzir a uma fissura, mas que pode resultar em sutis diferenças (Neiswanger *et al.*, 2006). A presença de anomalias dentais, alterações musculares, incluindo defeitos no músculo orbicular da boca, anormalidades craniofaciais como alterações antropométricas do cérebro, assimetria facial e padrões de assimetria entre as mãos (Weinberg *et al.*, 2006; Neiswanger *et al.*, 2007; Marazita, 2007; Murthy & Bhaskar, 2009; Lu *et al.*, 2009) tem sido relacionadas às FL/PNS e familiares, indicando a existência de subfenótipos. O enriquecimento do fenótipo das FL/PNS pode direcionar com maior precisão os estudos de genes com susceptibilidade para fissura (Weinberg *et al.*, 2006).

#### **2.4.1. Fatores ambientais**

A exposição a fatores ambientais de risco no início da gestação é relacionada às FL/PNS. Esta relação é reforçada por trabalhos que mostram que o planejamento da gravidez parece ter um efeito protetor para o desenvolvimento de FL/P (revisado por Mossey *et al.*, 2009). Fatores ambientais tais como dieta e suplementação vitamínica materna, alcoolismo, tabagismo, uso de drogas durante o primeiro trimestre de gestação e idade avançada dos pais podem contribuir para o desenvolvimento de FL/PNS (Vieira, 2008).

Alguns trabalhos sugerem que estado nutricional materno tenha algum papel na etiologia das FL/PNS (Krapels *et al.*, 2004; van Rooij *et al.*, 2004). Estudos demonstram que a suplementação materna com multivitaminas no primeiro trimestre gestacional pode diminuir o risco de filhos com FL/PNS (Briggs, 1976; Czeizel, 1993; Loffredo *et al.*, 2001b). Em um estudo de meta-análise, o uso de complexos multivitamínicos reduziu em 25% a prevalência de FL/PNS (Johnson & Little, 2008). Uma associação entre a deficiência de ácido fólico e defeitos nas estruturas derivadas do tubo neural, como lábio e palato, está bem estabelecida na literatura (Antony, 2007; Boyles *et al.*, 2008). O ácido fólico, uma vitamina do complexo B, é essencial para a biossíntese de bases nitrogenadas e aminoácidos durante a divisão celular e crescimento tecidual, eventos iniciais necessários para a formação normal do tubo neural (Zeiger & Beaty, 2002; Blom *et al.*, 2006). Mais recentemente, tem sido proposta uma associação entre FL/PNS e genes de enzimas que controlam o metabolismo do ácido fólico (Boyles *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008a; Carroll *et al.*, 2009). Em um estudo recente, nosso grupo avaliou o envolvimento de variantes polimórficas nos genes *MTHFR*, *MTHFD1*, *MTR* e *SLC19A1* que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo do ácido fólico e identificou que mães carregando a variante alélica A do polimorfismo rs2274976 no gene *MTHFR* (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase) apresentam um risco aumentado em 6x para ter um filho com FL/PNS (Bufalino *et al.*, 2010).

O consumo excessivo de bebidas alcoólicas durante o primeiro trimestre de gestação tem sido considerado um importante fator de risco para FL/PNS (Lorente *et al.*, 2000; Spilson *et al.*, 2001; Zarante *et al.*, 2009). Um estudo encontrou que mães de filhos com FL/PNS que consumiram 5 ou mais doses/dia durante o primeiro trimestre de gestação apresentaram um risco maior de ter um filho com FL/PNS quando comparadas àquelas mães que nunca consumiram álcool ou àquelas que deixaram de consumir bebidas alcoólicas durante a gestação (DeRoo *et al.*, 2008). Outro estudo sugeriu que a associação entre consumo de álcool e FL/PNS pode ser influenciada pelo tipo de bebida (bebida destilada > vinhos >

cerveja) e o uso de ácido fólico (Romitti *et al.*, 2007). É possível que as variações genéticas no desenvolvimento craniofacial (Romitti *et al.*, 1999), metabolismo do álcool (Chevrier *et al.*, 2005) e metabolismo do ácido fólico (Prescott & Malcolm, 2002) possam ser responsáveis pelas influências do consumo de bebidas alcoólicas no risco para o desenvolvimento das FL/PNS.

O tabagismo durante o primeiro trimestre de gestação tem sido associado de forma consistente com as FL/PNS (Honein *et al.*, 2007; Vieira, 2008). Lorente e colaboradores (2000) investigaram o uso do tabaco durante a gravidez e demonstraram um aumento no risco de ocorrência de FL/PNS. Além disso, foi observado que o risco aumenta com o número de cigarros consumidos durante a gestação. É interessante observar que embora a influência pareça ser pequena, o tabagismo passivo durante o primeiro trimestre de gestação também eleva o risco de nascimento de uma criança com FL/PNS (Jiyanan *et al.*, 2009).

Idade materna é considerada como fator de risco para diversas alterações cromossômicas, mas não existe consenso se representa ou não fator de risco para FL/PNS (Vieira *et al.*, 2002). Estudo realizado na Califórnia mostrou que mulheres com mais de 39 anos apresentavam duas vezes mais risco de ter um filho com FL/P comparado a mães com idade entre 25 e 29 anos (Shaw *et al.*, 1991). Trabalho realizado por nosso grupo constatou que a idade materna foi significativa para ocorrência de fissuras, sendo que os intervalos temporais de 26 a 35 anos e acima de 35 anos apresentaram riscos reduzidos para ocorrência de FL/PNS comparados a mulheres com idade até 25 anos (Martelli *et al.*, 2010). Uma relação positiva entre idade paterna avançada e o desenvolvimento de FL/PNS, em particular FP isoladas, também já foi observada (Materna-Kiryluk *et al.*, 2009). Por outro lado, outros estudos não demonstraram estas associações (Blanco-Davila *et al.*, 2003; Jamilian *et al.*, 2007).

Enfermidades crônicas e condições sistêmicas da mãe, como diabetes e obesidade, durante a gestação podem estar relacionadas com o aumento do risco de ter um filho com FL/PNS, por meio de alterações fisiológicas ou pela ação de medicamentos usados em seu tratamento (Spilson *et al.*, 2001; Cedergren &

Källén, 2005; Puho *et al.*, 2007). O uso de medicações durante o período de formação fetal (primeiro trimestre de gestação), especialmente corticóides (Rodriguez-Pinilla & Martinez-Frias, 1998), nifedipina (Zarante *et al.*, 2009) e antifolatos (Hernandez-Diaz *et al.*, 2000), também é associado a um elevado risco para o nascimento de uma criança com FL/P. Estudo realizado por Krapels e colaboradores (2006) encontrou uma forte associação entre o uso de analgésico, drogas contra infecções, anticoncepcional, corticóides e drogas com ação simpaticomimética e o desenvolvimento de FL/PNS. O grupo de anticonvulsivantes, especialmente a difenilhidantoína, fenobarbital, carbamazepina e valproato de sódio, são os mais amplamente estudados e com efeitos comprovados sobre as FL/PNS (Leite *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005). A exposição ocupacional materna a solventes orgânicos e a exposição dos pais a produtos químicos agrícolas tem sido associada, de forma inconsistente, às FL/PNS (Garcia, 1998; Shaw *et al.*, 2003).

#### **2.4.2. Fatores Genéticos**

Uma variedade de abordagens genéticas tem sido utilizada para identificar múltiplos genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial. Parte dos genes candidatos nas FL/P foi sugerida através de estudos com modelos experimentais em animais “*knockouts*”, especialmente camundongos (Juriloff & Harris, 2008), estudos de ligação e associação do genoma (Marazita & Neiswanger, 2002; Marazita *et al.*, 2004; Birnbaum *et al.*, 2009), citogenética (Brewer *et al.*, 1999; Higgins *et al.*, 2008), estudos de fissura associadas a síndromes mendelianas (Kondo *et al.*, 2002) e análises de expressão gênica em tecidos embrionários humanos e de camundongos (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2005). A diversidade de eventos embriológicos que contribuem para a formação das estruturas faciais reflete no grande número de genes conhecidos ou suspeitos de estarem envolvidos na formação de fissura (Jugessur *et al.*, 2009).

Os estudos atuais de ligação e de associação do genoma, abrangendo diversas populações, demonstram que inúmeros genes e loci gênicos, situados

em diferentes regiões cromossômicas tais como 17p13.1 (Wyszynski *et al.*, 2003), 8p11-23 (Riley *et al.*, 2007b), 19p13.12, 19q12 e 2q22.3 (Vieira *et al.*, 2008b), 9q21 e 1p32 (Marazita *et al.*, 2009), 8q24.21 (Grant *et al.*, 2009; Birnbaum *et al.*, 2009), 10q25.3 e 17q22 (Mangold *et al.*, 2010), e 6q14.2-14.3 (Letra *et al.*, 2010), podem estar relacionados à etiologia das FL/PNS. Estes loci contêm centenas de genes de função ainda desconhecida e vários genes que participam das vias de sinalização associadas ao desenvolvimento do lábio e do palato.

O estudo de polimorfismos genéticos também tem sido utilizado para avaliar a relação de variantes alélicas em FL/P. Polimorfismos são alterações na sequência de um gene, ou seja, mutações no DNA com frequência esperada na população geral de pelo menos 1%. Existem vários tipos de polimorfismos no genoma decorrentes de substituições, deleções, inserções ou duplicações na sequência de nucleotídeos. De uma maneira geral, os polimorfismos podem ou não estar associados a uma determinada doença. O tipo mais comum de polimorfismo genético é o polimorfismo de um único nucleotídeo, do inglês “*single nucleotide polymorphism*” (SNP). São formas variantes na sequência de DNA que podem estar presentes nos indivíduos de uma população dentro de uma variação considerada normal. A hipótese de que a forma variante possa estar associada à função alterada de um gene em particular e, por consequência, exercer algum papel na etiologia das fissuras orais pode ser verificado através do estudo das frequências desses polimorfismos em indivíduos afetados (casos) e não afetados (controles) (Prescott *et al.*, 2000).

Dentre os genes associados às FL/PNS, destacam-se: *IRF6*, *TGF $\alpha$*  (fator de crescimento transformante alfa), *MSX1* (*Muscle Segment Homeobox*), *TGF $\beta$ 3* (fator de crescimento transformante beta 3), *JAG2* (*JAGGED2*), *FGF7* (fator de crescimento de fibroblastos 7), *FGF10*, *FGF18*, *FGFR1* (receptor do fator de crescimento de fibroblasto 1), *FGFR2* e *MYH9* (*myosin, heavy chain 9, non-muscle*) (van den Boogaard *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2003; Marazita *et al.*, 2004; Riley *et al.*, 2007a; Menezes *et al.*, 2008; Rahimov *et al.*, 2008; Scapoli *et al.*, 2008; Birnbaum *et al.*, 2009).

Mutações no fator regulador de interferon 6 (*IRF6*) foram identificadas em afetados da síndrome de Van der Woude (SVW), uma alteração autossômica dominante caracterizada pela presença de FL/P em associação com fossetas de lábio inferior (Paranaíba *et al.*, 2008). É importante ressaltar que inúmeros estudos demonstraram que variações no gene *IRF6* podem estar associadas às FL/PNS em diferentes populações (Blanton *et al.*, 2005; Ghassibe *et al.*, 2005; Scapoli *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2007). Em particular, o polimorfismo rs2235371 do gene *IRF6*, que resulta na substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 274 da sequência de aminoácidos (Val274Ileu) da estrutura protéica de *IRF6*, foi associado de forma significativa às FL/PNS (Jugessur *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009). Em adição a estes achados, Rahimov e colaboradores (2008) demonstraram uma forte associação entre FL e o polimorfismo rs642961 do gene *IRF6* e demonstraram também que a associação entre o polimorfismo rs2235371 de *IRF6* e fissuras é dependente do polimorfismo rs642961. Recentemente, nosso grupo avaliou a associação dos polimorfismos rs2235371 e rs642961 do gene *IRF6* na população brasileira. A frequência de genótipo variante no polimorfismo rs2235371 foi identificada em 10,1% dos indivíduos com FL/PNS e em 10,3% do grupo controle, revelando uma diferença não significativa. Similarmente, a frequência dos genótipos raros do polimorfismo rs642961 (GA e AA) foi muito similar entre os grupos controle (28,6%) e FL/PNS (25,4%). Estes resultados são consistentes com uma falta de envolvimento dos polimorfismos rs2235371 e rs642961 no gene *IRF6* na patogênese das FL/PNS na população brasileira (Paranaíba *et al.*, 2010a).

Um estudo não encontrou uma associação positiva entre o genótipo fetal para os genes do desenvolvimento *TGF $\alpha$*  e o aumento no risco da prole apresentar uma FL/PNS (Chevrier *et al.*, 2008). Resultados similares para o gene *TGF $\alpha$*  também foram observados em estudos prévios (revisado por Vieira, 2006). Estudo realizado por Riley *et al.* (2007a) revelou que genes da família *FGF* e *FGFR* podem contribuir com 3-5% das FL/PNS. Mutações no gene *FGFR1* também têm sido descritas em pacientes com síndrome de Kallmann com FL/P



e/ou agenesias dentais (Kim *et al.*, 2008). Dentre os genes associados às síndromes, *PVRL1*, gene responsável pela síndrome da displasia ectodérmica e FL/P, é um dos genes em que variações polimórficas foram fortemente relacionadas às FL/PNS (Scapoli *et al.*, 2004). Outro gene já estudado em FL/PNS é o *TP63*, encontrado mutado na síndrome da ectrodactilia, displasia ectodérmica e FLP (EEC). No entanto, mutações em *TP63* nos casos de FL/PNS, se existem, são raras (Barrow *et al.*, 2002; Scapoli *et al.*, 2008).

Outros genes, incluindo *BMP4*, *TBX22*, *RAR $\alpha$* , *SUMO1* e *GABRB3* demonstraram alguma correlação com a etiologia das FL/PNS (Prescott *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2004; Carinci *et al.*, 2007; Birnbaum *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009; Jianyan *et al.*, 2009). No entanto, frente aos resultados inconclusivos ou conflitantes de inúmeros estudos, nenhum destes genes foi definitivamente confirmado estar associado à etiopatogenia das FL/PNS.

### **TGF $\beta$ 3 (Fator de Crescimento Transformante $\beta$ 3)**

Os genes dos fatores de crescimento transformantes (*TGF $\beta$* ) codificam mais de 30 proteínas ligantes. Os membros dessa família apresentam estruturas semelhantes, porém funcionalmente os diversos fatores de crescimento podem regular muitos aspectos do comportamento celular. (Sanford, 1997). Foram inicialmente estudados como fatores que promoviam crescimento celular em cultura, mas logo ficou claro que poderiam promover ou inibir o crescimento, dependendo do tipo de célula examinada e da presença de outros fatores de crescimento (Sanford, 1997). Esses genes desempenham papel importante na embriogênese através de interações epitélio-mesênquimais, proliferação celular, condrogênese e apoptose (Proetzel *et al.*, 1995). Em geral, os *TGF* são mitogênicos para células de origem mesenquimal e inibitórios para células de origem epitelial (Massagué, 1990).

Estes fatores de crescimento são codificados pela família gênica *TGF* que inclui os genes: *TGF $\alpha$* , *TGF $\beta$ 1*, *TGF $\beta$ 2* e *TGF $\beta$ 3*. *TGF $\beta$*  são moléculas

sinalizadoras extracelulares que têm potencial para modificar migração, e localização celular, por meio de processos em parte relacionados à adesão celular e interações complexas entre receptores celulares e componentes da matrix-extracelular (Massagué, 1990). O gene *TGFβ3* está localizado na região cromossômica 14q24, possui 7 éxons, codifica uma proteína de 412 aminoácidos e apresenta regiões altamente conservadas alternadas com regiões de menor conservação entre as espécies estudadas. É expresso principalmente nas células do epitélio da parte medial dos folhetos palatinos, sendo importante na adesão do epitélio medial e eliminação do epitélio entre os folhetos logo após a fusão (Proetzel *et al.*, 1995). Estudos feitos em modelos animais mostraram que o gene *TGFβ3* tem papel importante na palatogênese, uma vez que camundongos “*knockouts*” apresentaram FP (Proetzel *et al.*, 1995; Sanford *et al.*, 1997).

A importância da expressão do *TGFβ3* é apoiada por estudos que mostram que as moléculas envolvidas nas vias de sinalização do *TGFβ3*, incluindo receptores (Ito *et al.*, 2003; Dudas *et al.*, 2004; Nakajima *et al.*, 2007) e reguladores (Cui *et al.*, 2005), também estão criticamente envolvidas na fusão de palato. Alguns trabalhos indicaram que *TGFβ3* desempenha papel fundamental em várias etapas da palatogênese: (1) Está envolvido na adesão das prateleiras palatinas através da indução de proteoglicanos de sulfato de condroitina sobre a superfície das células *MEE* (Gato *et al.*, 2002); (2) Atua na degradação da membrana basal, durante a fusão do palato através da indução de metaloproteinases de matriz (Blavier *et al.*, 2001) sendo importante para a remodelação extracelular da matriz; (3) e é importante para o desaparecimento das células *MEE* (Martinez-Alvarez *et al.*, 2000). Estudo realizado por Choi e colaboradores (2009), em modelo animal, concluiu que o *TGFβ3* estimula uma via de apoptose nas células *MEE* e da adesão entre as prateleiras palatinas.

Em humanos, os resultados de estudos com o gene *TGFβ3* e fissuras orais ainda são controversos, com relatos mostrando associação deste gene com as FL/PNS (Kim *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004; Ichikawa *et al.*, 2006) enquanto outros não mostram a associação do mesmo com as FL/PNS (Lidral *et al.*, 1998;

Tanabe *et al.*, 2000; Morkūnienė *et al.*, 2007). Até recentemente, muitos estudos utilizaram uma repetição CA localizada 61.215 pb a montante do ponto de partida da tradução assim como um marcador VNTR na região 5' não traduzida (URT) para testar a participação do gene (Lidral *et al.*, 1998; Beaty *et al.*, 2002). Já um estudo realizado por Ichikawa e colaboradores (2006), visando uma cobertura mais completa do gene, avaliou um total de 23 polimorfismos em uma população japonesa afetada por FL/PNS. Estes autores observaram uma associação significativa, com  $p < 0,01$ , em quatro polimorfismos e  $p < 0,05$  em um adicional de cinco polimorfismos no gene *TGFβ3*. Maestri e colaboradores (1997) mostraram que polimorfismos nos éxons 2 e 5 do gene possuem uma alta associação com FP. Sato e colaboradores (2001) consideraram que polimorfismos no *TGFβ3*, ou em sequências de DNA adjacentes, poderiam contribuir para o desenvolvimento de fissuras na população japonesa. Outro estudo demonstrou uma associação entre *TGFβ3* e FL, mas não com a FP (Jugessur *et al.*, 2003). Kim e colaboradores (2003) investigaram a relação do polimorfismo *SfaN1* (localizado no intron 5) desse gene com relação ao risco de FLP na população coreana. A distribuição dos genótipos *SfaN1* foi diferente entre os pacientes afetados por FLP e do controle sendo fortemente associado com um risco aumentado de fissura nos homens, mas não nas mulheres. Trabalho realizado em pacientes com FL/P e pais (204 trios) relatou uma forte evidência para origem materna e paterna, com menor risco de transmissão materna em comparação com risco de transmissão paterna do alelo T com relação ao polimorfismo rs2300607. Isso também é expresso em um risco aumentado de crianças heterozigotas com o alelo T herdado do pai. Os autores sugeriram que há um papel importante do *TGFβ3* no desenvolvimento de fissuras orais, mas consideraram que essa hipótese ainda necessita de mais estudos funcionais para mostrar qualquer efeito de variantes alélicas na ativação do *TGFβ3* (Reutter *et al.*, 2008).

## **MSX1 (*Muscle Segment Homeobox*)**

Genes *MSX* são genes *homeobox* que possuem um importante papel na indução da interação epitélio-mesenquimal e, conseqüentemente, na organogênese de vertebrados (Thesleff *et al.*, 1995). Estes genes atuam subdividindo o embrião em grupos celulares, os quais apresentam potencial para se transformar em tecidos e órgãos específicos. As proteínas codificadas pelos genes *homeobox* possuem em comum um homeodomínio altamente conservado entre as espécies, cuja função é reconhecer seqüências específicas de DNA nos genes alvo, visando controlar a expressão destes por meio de ativação ou depressão das vias sinal-transdução (Ivens *et al.*, 1990).

Dentre a família de genes *MSX*, o *MSX1* é um fator fundamental para o desenvolvimento do esqueleto craniofacial. O gene *MSX1* está localizado na região cromossômica 4p16.1, possui 2 éxons, codifica uma proteína de 297 resíduos e regiões altamente conservadas entre as espécies, o que sugere um papel importante no desenvolvimento. Múltiplas linhas de evidências sugerem que o gene *MSX1* está envolvido na promoção do crescimento e inibição da diferenciação (Blin-Wakkach *et al.*, 2001). Em ratos, a expressão do *MSX1* na cabeça está localizada principalmente nas regiões de migração e diferenciação de células da crista neural bem como nas células mesenquimais derivadas (Hill *et al.*, 1989; Mackenzie *et al.*, 1991). A proteína *MSX1* também é encontrada em uma variedade de tecidos embrionários que possuem interações epitélio-mesenquimais em sua morfogênese, como por exemplo, folículos pilosos, germes dentários e cauda. Camundongos deficientes em *MSX1* apresentam malformações craniofaciais e dentárias, tais como fissura palatina, redução do comprimento da mandíbula, anomalias nos ossos nasal, frontal e parietal, bem como retardo no desenvolvimento de dentes, sugerindo um papel desse gene no desenvolvimento desses tecidos (Vastardis *et al.*, 1996).

A primeira evidência da participação de *MSX1* na etiologia das FL/P foi quando uma geração de camundongos “*knockouts*” apresentou FP e outras anomalias craniofaciais, como hipoplasia de maxila e oligodontia (Satokata &

Mass, 1994). Em humanos, mutações em *MSX1* foram, inicialmente, identificadas causando uma forma autossômica dominante de agenesia dental (Vastardis *et al.*, 1996). Subsequentemente, Van Den Boogaard e colaboradores (2000) identificaram uma mutação em *MSX1* sendo a causa de um padrão familiar de agenesia dental associada à FLP e FP. Além disso, a falta de expressão do *MSX1* é comumente encontrada em casos da Síndrome 4p-/Hirschhorn, na qual a presença de FL/P é uma característica comum. (Battaglia *et al.*, 2001). Um trabalho recente avaliou os genes *MSX1* e *PAX9* (*Paired box 9*) em ratos, já que ambos são co-expressos durante o desenvolvimento craniofacial e que ratos mutantes homozigotos para esses genes apresentam FP e detenção precoce na formação do dente. Os autores avaliaram que uma redução combinada na dosagem de *PAX9* e *MSX1* em seres humanos poderia aumentar o risco de FL/P e oligodontia (Nakatomi *et al.*, 2010).

Uma extensa análise do *MSX1* em 917 pacientes de várias etnicidades com FL/P identificou mutações em 16 pacientes com FLP e FP, fornecendo evidências que este gene pode estar envolvido em ambas as formas de fissuras. Os autores estimam que mutações em *MSX1* contribuem para 2% de todos os casos de FL/PNS, principalmente aqueles com FLP (Jezewski *et al.*, 2003). Um estudo sugeriu que o risco de desenvolvimento de FL/PNS aumenta quando existe exposição materna ao fumo e ao álcool em associação com a presença de variantes polimórficas específicas no gene *MSX1* (Romitti *et al.*, 1999) e que mutações nesse gene parecem estar envolvidas com casos de FL/PNS com história familiar (van den Boogaard *et al.*, 2000). Relatos conflitantes têm sido publicados, sendo alguns com evidência de associação ou ligação do *MSX1* com FLP ou FP (Fallin *et al.*, 2003; Jugessur *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2003) e outros, sem nenhuma correlação com ambas as formas de fissuras (Mitchell *et al.*, 2001). Sugere-se que o motivo de divergências entre os resultados verificados na literatura se deva a etnicidade variada das populações investigadas.

Vieira e colaboradores, (2003b) propôs uma interação entre os genes *MSX1* e *TGFβ3* avaliando 217 crianças e respectivas mães de alguns países da

América do Sul. A análise conjunta desses genes sugeriu que pode haver uma interação entre esses dois loci para aumentar a susceptibilidade para FP e FLP. Estudo recente avaliou uma região em torno do *MSX1*, através de mapeamento de 393 polimorfismos em 297 trios de FLP e 84 trios de FP provenientes de Maryland, Taiwan, Cingapura e Coreia. Marcadores individuais e haplótipos de dois a cinco polimorfismos próximos ao gene *MSX1* mostraram evidência estatisticamente significativa com relação às FL/P. Dois genes (*STK32B* e *EVC*) próximos ao *MSX1* produziram evidências consistentes relacionadas a FLP nas populações avaliadas. Esses dois genes, além do gene *EVC2*, também foram associados a FP nos trios analisados, sugerindo que genes próximos ao *MSX1* podem influenciar o risco de FL/P (Ingersoll *et al.*, 2010). Jagomägi e colaboradores (2010) testaram associações entre 176 polimorfismos em 18 genes/locos candidatos para FL/PNS em um estudo caso-controle (153 pacientes, 205 controles). As associações mais significativas em FL/P foram encontradas em polimorfismos dos genes *MSX1*, *MTHFR* e *PVRL2* incluindo vários haplótipos comuns entre os genes *MTHFR* e *MSX1*. A associação mais forte para FLP foi observada no polimorfismo rs6446693 do gene *MSX1* e para FP, o polimorfismo rs11624283 do gene *JAG2*.

### ***MYH9 (myosin, heavy chain 9, non-muscle)***

O gene *MYH9*, codificante para a cadeia pesada de miosina não muscular IIA (NMMHCIIA, MIM 160775), representa uma das três miosinas da classe II expressas em células não musculares e que exercem força de contração (Heath *et al.*, 2001; Martinelli *et al.*, 2007). *MYH9* está localizado na região cromossômica 22q12.3, apresentando 41 éxons e codificando uma proteína de 1960 aminoácidos, alternando regiões altamente conservadas com áreas menos conservadas. Além do papel bem caracterizado de miosinas da classe II na contração e produção de força nos músculos, pouco se sabe sobre o seu papel funcional específico nas células não musculares (Sellers, 2000). Mutações no gene *MYH9* causam uma doença autossômica dominante, caracterizada por macrotrombocitopenias congênita, deficiência auditiva, catarata, alterações renais

(Seri *et al.*, 2003) além de surdez sensorineural autossômica dominante, não sindrômica (Heath *et al.*, 2001). Essas doenças autossômicas relacionadas ao *MYH9* não tem sido relacionadas à FL/P (Martinelli *et al.*, 2007).

Algumas evidências indicam que as isoformas não musculares têm papéis diferentes na citocinese, fagocitose, manutenção da forma da organela, e do transporte de partículas, bem como a mobilidade celular. NMMHCIIA parece desempenhar um papel durante os diversos processos celulares envolvidos na fusão do palato, incluindo a transformação epitelial-mesenquimal, migração e morte celular (Martinelli *et al.*, 2007). Estudo realizado durante o desenvolvimento de camundongos mostrou uma alta expressão do gene no palato, sendo abundantemente e, especificamente, expresso em células da *MEE* nas prateleiras antes da fusão. A expressão diminui gradualmente e se torna limitada a células epiteliais após a formação da *MES* (Marigo *et al.*, 2004).

Para avaliar se *MYH9* desempenha algum papel na etiologia das FL/PNS, uma análise foi realizada em 218 trios (pai, mãe e criança afetada), usando marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único. Dois polimorfismos adjacentes, rs 3752462 e rs 2009930, foram associados às FL/P, indicando que o gene *MYH9* pode ser um fator predisponente (Martinelli *et al.*, 2007). Birnbaum e colaboradores (2009b) conduziram um estudo avaliando sete polimorfismos no *MYH9* em uma amostra de 248 pacientes afetados por FL/PNS e seus pais, da região central da Europa e mostrou uma associação altamente significativa para o polimorfismo rs7078. A avaliação de haplótipos revelou que uma combinação de polimorfismos (rs7078, rs2071731, rs739097, rs5995288) estava associada de forma significativa às FL/PNS. Os autores consideraram que há o potencial envolvimento de *MYH9* na etiologia das FL/PNS, mas o seu papel patogênico precisa ser mais investigado.

Brett e colaboradores (2009), com objetivo de identificar genes relacionados às FL/PNS em famílias afro-americanas e não-hispânicas, avaliaram 6008 polimorfismos em quatorze regiões cromossômicas e identificou associação de quatro polimorfismos no gene *MYH9*. Um estudo recente avaliando a relação entre

fatores ambientais, FL/P e quatro polimorfismos no gene *MYH9*, encontrou significância estatística entre o polimorfismo rs16996652 e mães fumantes passivas (Jia *et al.*, 2010). A literatura científica parece corroborar a hipótese de que *MYH9* está envolvido na palatogênese e que variações nesse gene alteram a susceptibilidade às FL/P. Entretanto, isto ainda requer investigações mais consistentes em estudos humanos genéticos, bem como investigações com relação à verdadeira função desse gene no processo de desenvolvimento palatino (Martinelli *et al.*, 2007; Birnbaum *et al.*, 2009).

### **JAG2 (JAGGED2)**

*JAG2* é um gene que codifica um dos cinco ligantes de superfície celular para receptores da família *Notch* (receptores transmembrânicos). A via de sinalização *Notch* é um mecanismo de sinalização intercelular conservado que é essencial para o desenvolvimento embrionário adequado em numerosos organismos. *JAG2* é expresso no epitélio oral e é necessário para ativação *Notch1*. A ativação de *Notch1*, por sua vez, atua na diferenciação das células durante o desenvolvimento do palato (Jiang *et al.*, 1998; Casey *et al.*, 2006). *JAG2* localiza-se na região cromossômica 14q32, possui 26 éxons e codifica uma proteína de 1238 aminoácidos, apresentando regiões conservadas e essenciais para a acoplagem de genes como o *p63*, que participa da regulação da expressão de *JAG2* e quando mutado é responsável pela síndrome da EEC, caracterizada pela tríade de ectrodactilia das mãos e pés, displasia ectodérmica e FL/P (van Bokhoven *et al.*, 2001). Estudos identificaram que variações na sequência de elementos regulatórios de *JAG2* podem contribuir para as FL/PNS em diferentes populações. O polimorfismo não sinônimo rs1057744 tem sido fortemente correlacionado a maior frequência de FL/PNS em várias populações (Vieira *et al.*, 2005; Neiswanger *et al.*, 2006, Scapoli *et al.*, 2008).

Fusões patológicas do palato com a mandíbula ou da língua com o palato têm sido relatados em humanos e outros mamíferos, mas os mecanismos moleculares e celulares que impedem essas adesões aberrantes durante o



desenvolvimento normal do palato ainda não são completamente compreendidos (Casey *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2009). Um estudo avaliou a função de gene *JAG2* em camundongos, através de uma mutação específica que remove um domínio da proteína Jagged2, necessário para a interação com o receptor. Camundongos homozigotos para a mutação apresentaram FP e fusão da língua com palato. Além disso, observou-se ainda sindactília e defeitos no desenvolvimento do timo (Jiang *et al.*, 1998). Trabalho realizado por Casey e colaboradores (2006) também mostrou que camundongos deficientes em *JAG2* apresentam fissura palatina associada a fusões do palato com a língua. Em camundongos mutantes para *JAG2*, a ativação de *Notch1* foi significativamente reduzida durante o desenvolvimento do palato. Os autores sugeriram que a sinalização *Jag2-Notch1* é espaço-temporalmente regulada no epitélio oral, evitando a adesão das prateleiras palatinas com outros tecidos da boca e facilitando a aderência normal entre as prateleiras durante a elevação palatina.

Neiswanger e colaboradores (2006) avaliaram os genes *PVRL1* (*Poliovirus receptor-related 1*), que expressa uma molécula de adesão célula a célula, e *JAG2* em 155 indivíduos de 25 famílias da Guatemala, sendo que 28 membros eram afetados por FL/P e 10 apresentavam alterações no músculo orbicular da boca. Os genes mostraram uma possível associação com a FL/PNS, que se tornou ligeiramente mais forte quando membros da família com defeitos musculares foram incluídos na análise como afetados. Um estudo, com 239 pacientes e pais, investigou os genes *TP63* (*transformation-related protein 63*), *MID1* (*Midline-1*) e *JAG2* em FL/PNS. O gene *TP63* está relacionado à síndrome que apresenta a tríade ectodactilia, displasia ectodérmica e FL/P e o gene *MID1* está associado à síndrome de Opitz. Não foi encontrada nenhuma associação entre alelos ou haplótipos de polimorfismos em *TP63*, entretanto os resultados indicaram que *JAG2* e *MID1* podem estar envolvidos na etiologia das FL/PNS (Scapoli *et al.*, 2008). Mutações no *IRF6* estão relacionadas à síndrome de Van der Woude (Paranaíba *et al.*, 2008) e síndrome do Pterígio Poplíteo (Froster-Iskenius, 1990), que apresentam FL/P em seu espectro clínico. Um estudo com camundongos

relacionou o gene *IRF6* e *JAG2* e demonstrou que esses genes são essenciais no controle da adesão e fusão do palato, pois apresentam vias de sinalização convergentes e, conseqüentemente, uma função combinada na formação/diferenciação da periderme oral (Richardson *et al.*, 2009). Em estudo recente mostrou, através de análise de marcador único e haplótipo, uma associação do polimorfismo rs1022431 com FL/PNS, sendo que o alelo A estaria associado a um risco maior. A associação mais significativa com FP foi observada para o polimorfismo rs11624283. Os autores consideraram que variantes polimórficas do *JAG2* podem estar envolvidas na etiologia de FL/P (Jagomägi *et al.*, 2010).

### **3. OBJETIVOS**

---

---

#### **3.1. Objetivo Geral**

Comparar a frequência alélica e genotípica de polimorfismos presentes nos genes *MSX1*, *TGFβ3*, *MYH9* e *JAG2* entre indivíduos com e sem fissuras lábio-palatinas não sindrômicas.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

**3.2.1.** Verificar a presença de novos polimorfismos presentes nos genes *MSX1*, *TGFβ3* e *MYH9*;

**3.2.2.** Verificar a presença do polimorfismo rs1057744 do gene *JAG2*;

**3.2.3.** Comparar as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos controle e caso.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

---

---

### **4.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa**

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos, deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP (processo nº. 152/2009; Anexo 1).

### **4.2. População**

As amostras deste estudo foram divididas em 2 grupos: grupo controle que foi constituído por amostras de 413 indivíduos não afetados por FL/P e grupo caso, composto por amostras de 367 pacientes com FL/PNS. O grupo controle apresentava indivíduos sem histórico familiar de síndromes, FL/P ou ainda qualquer alteração congênita. O grupo caso apresentava FL/PNS, sem qualquer alteração congênita adicional e sem histórico familiar de síndromes ou alterações congênitas. Todas as amostras dos pacientes analisados foram obtidas na Universidade José do Rosário Vellano - (UNIFENAS), Alfenas, Minas Gerais, Brasil, no período de janeiro de 2009 a outubro de 2010. A coleta das amostras do grupo de pacientes com FL/PNS foi realizada no Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade José do Rosário Vellano (Centro Pró-Sorriso - Centrinho), durante o tratamento odontológico oferecido aos indivíduos fissurados. Todos os pacientes do grupo caso foram examinados pela Equipe Multidisciplinar (pediatra, cirurgião-plástico, estomatopatologistas, fonoaudiólogo, psicólogo, fisioterapeuta, enfermeiras, nutricionistas, ortodontistas) do Centro referido. A avaliação de paciente sindrômico ou não sindrômico foi feita através de exame clínico, auxiliado por exames complementares quando necessário. Foram excluídos desta investigação os pacientes afetados por qualquer alteração sistêmica e anomalias congênitas, exceto as fissuras no grupo caso. A coleta das amostras do grupo controle procedeu-se na Clínica de Graduação, adjacente ao

Centro Pró-Sorriso, desta mesma instituição durante o tratamento odontológico, oferecido a pacientes que procuram por atendimento.

#### 4.3. Seleção dos Genes Candidatos e dos Polimorfismos Gênicos

Este estudo selecionou genes (*TGFβ3*, *MSX1*, *JAG2* e *MYH9*) que quando mutados possuem FL/PNS como uma característica fenotípica. Para a seleção dos polimorfismos levou-se em consideração: 1) estar localizado em uma região de éxon; 2) ser um polimorfismo não-sinônimo e 3) estar em uma região de sítio de restrição. As características dos polimorfismos estão descritas na Tabela 1.

Foram realizadas análises das mutações encontradas nos *websites* *ESEfinder* (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) para avaliar a possibilidade de alterações nos sítios de *splicing* e *Polyphen* (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>) para checar possíveis danos na proteína causados pelas mutações não sinônimas dos polimorfismos selecionados.

**Tabela 1.** Descrição dos polimorfismos gênicos deste estudo.

Gene	rs	Polimorfismo	Resíduo de Aminoácido	Referência*
<i>TGFβ3</i>	rs34019007	c.170G>A	p.Pro57Leu	<a href="#">ENST00000238682</a>
<i>TGFβ3</i>	rs4252315	c.179C>T	p.Thr60Met	<a href="#">ENST00000238682</a>
<i>MSX1</i>	rs62636562	c.821C>T	p.Ala274Val	<a href="#">ENST00000382723</a>
<i>JAG2</i>	rs1057744	c.1501G>A	p.Glu501Lys	<a href="#">ENST00000331782</a>
<i>MYH9</i>	rs11549910	c.4595A>G	p.Gln1532Arg	<a href="#">ENST00000216181</a>
<i>MYH9</i>	rs11549909	c.4600G>C	p.Val1534Leu	<a href="#">ENST00000216181</a>

\*Informações provenientes do site: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

#### **4.4. Coleta das Amostras para Análise dos Polimorfismos**

Previamente à coleta, todos os voluntários foram informados do propósito do estudo. Aqueles que se enquadravam dentro dos critérios previamente estabelecidos e concordaram em participar voluntariamente da pesquisa foram solicitadas a assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido de participação na pesquisa. As amostras de células bucais foram coletadas através de um bochecho, por 60 s, de 5 ml de solução de sacarose a 3%. O conteúdo resultante do bochecho foi transferido para um tubo de 15 ml, o qual continha o volume de 5 ml de uma solução 66% alcoólica contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl e 7 mM EDTA.

#### **4.5. Isolamento do DNA**

No laboratório (Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP-UNICAMP), foi adicionada água destilada e deionizada autoclavada q.s.p. 15 ml a cada tubo. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado em solução aquosa, contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl e 7 mM EDTA. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA, 0,2 µg de proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubado a 50°C em movimento contínuo semicircular. Após 16 h de incubação, foi adicionado 500 µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 min a 12.000 g a 4°C. O precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol, centrifugado (12.000 g por 5min), seco e ressuscitado em tampão Tris-EDTA (TE Buffer). A concentração e pureza das amostras foram determinadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm (espectrofotômetro Genesys 2, Spectronic Inst., Rochester, NY, EUA).

#### **4.6. PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase Associada à Análise de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição Enzimática)**

As reações de PCR-RFLP foram realizadas com pares de oligonucleotídeos específicos para cada um dos polimorfismos dos genes deste estudo (Tabela 2). Os oligonucleotídeos foram desenhados com o auxílio do programa IDT PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/home/home.aspx>) com sequências dos respectivos genes provenientes do “Gene Bank”. A especificidade de cada par de oligonucleotídeos foi testada no programa BLAST (*National Center for Biotechnology Information*-NIH, EUA - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Resumidamente, 500 ng de DNA foram amplificados em um termociclador (modelo 9600, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em uma reação de 10 µl composta por 1 µM de cada oligonucleotídeo, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM dNTPmix e 0,025 UI de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As condições das reações de PCR são descritas na Tabela 2. Após amplificação, os produtos de PCR foram incubados com as enzimas de restrição específicas para a análise de cada polimorfismo (Tabela 3), segundo recomendações do fabricante (Fermentas Inc., Hannover, MD, EUA). Os produtos da digestão foram separados eletroforicamente em gel de poliacrilamida 8% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Invitrogen). A documentação foi realizada no sistema de fotodocumentação *Kodak Digital Science*<sup>TM</sup> equipado com câmera digital DC120 em com programa *1D Image Analysis* (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA).

**Tabela 2.** Pares de primers utilizados neste estudo.

Polimorfismo	Alelos	Oligonucleotídeos*	Anelamento	Amplicon
rs34019007	Ancestral: G	F: 5' TGGACTTCGGCCACATCAAGAAGA 3'	62 <sup>o</sup>	276 pb**
	Variante: A	R: 5' ATTTGGACTTACTGTGCTCCGCCA 3'		
rs4252315	Ancestral: C	F: 5' TGGACTTCGGCCACATCAAGAAGA 3'	62 <sup>o</sup>	276 pb
	Variante: T	R: 5' ATTTGGACTTACTGTGCTCCGCCA 3'		
rs62636562	Ancestral: C	F: 5' ACTACAAGAGGCAGAGCTGGAGAA 3'	60 <sup>o</sup>	366 pb
	Variante: T	R: 5' AGGGAGCAAAGAGGTGAAACTGGA 3'		
rs1057744	Ancestral: G	F: 5' TGGTGAACGGGTACCAGTGTGTGT 3'	62 <sup>o</sup>	386 pb
	Variante: A	R: 5' ATCACAACAAGCAATGGCCACAGG 3'		
rs11549910	Ancestral: A	F: 5' AGGATGATGTGGGCAAGAGTGTGA 3'	64 <sup>o</sup>	372 pb
	Variante: G	R: 5' TGACCAGCTGCTTCTTCTTCTCCT 3'		
rs11549909	Ancestral: G	F: 5' AGGATGATGTGGGCAAGAGTGTGA 3'	64 <sup>o</sup>	372 pb
	Variante: C	R: 5' TGACCAGCTGCTTCTTCTTCTCCT 3'		

\*Oligonucleotídeos: Forward (F) e Reverse (R). \*\*pb: pares de base

**Tabela 3.** Enzimas de restrição utilizadas neste estudo e padrão dos fragmentos de restrição após digestão.

Polimorfismo	Gene	Enzima	Genótipos
rs34019007	<i>TGFβ3</i>	<i>DdeI</i>	GG: 194, 63 e 19 pb GA: 213, 194, 63 e 19 pb AA: 213 e 63 pb
rs4252315	<i>TGFβ3</i>	<i>HpyCH4III</i>	CC: 172, 92 e 12 pb CT: 264, 172, 92 e 12 pb TT: 264 e 12 pb
rs62636562	<i>MSX1</i>	<i>BsmAI</i>	CC: 366 pb CT: 366, 228 e 138 pb TT: 228 e 138 pb
rs1057744	<i>JAG2</i>	<i>BsmBI</i>	GG: 317 e 69 pb GA: 386, 317 e 69 pb AA: 386 pb
rs11549910	<i>MYH9</i>	<i>BbvI</i>	AA: 163, 90, 41, 24 e 6 pb AG: 187, 163, 90, 41, 24 e 6 pb GG: 187, 90, 41, 24 e 6 pb
rs11549909	<i>MYH9</i>	<i>AlwNI</i>	GG: 372 pb CG: 372, 206 e 166 pb CC: 206 e 166 pb



#### **4.7. Análise Estatística**

Cálculos do poder do estudo foram realizados com a ajuda do Programa G\*Power 3.1 (Faul *et al.*, 2009). O teste de Mann-Whitney foi aplicado para verificar se existia uma diferença na idade entre os grupos controle e caso, enquanto que o teste qui-quadrado foi utilizado para comparar a distribuição do gênero e raça/cor de pele dos voluntários entre os grupos. A existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada (Rodriguez *et al.*, 2009), e as diferenças na frequência dos alelos e genótipos em um modo de herança não-restrito, recessivo e dominante foram comparadas pelo teste de qui-quadrado.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características Gerais dos Grupos

O grupo caso foi composto por 367 pacientes, sendo que 198 (54%) foram do gênero masculino e 169 (46%) do feminino. A idade média dos pacientes foi de  $19,1 \pm 14,9$  anos, sendo que houve variação de 1 mês de vida a 61 anos, relacionada ao momento de coleta das amostras das células bucais. Quanto a cor da pele, houve prevalência de indivíduos feodermas (156 pacientes, 42,5%), seguida pela cor da pele leucoderma (154 pacientes, 42,0%) e a melanoderma (57 pacientes, 15,5%). Quanto ao tipo de fissura, 198 (54%) pacientes apresentaram FLP, 88 (24%) FL e 81 (22%) FP. No grupo controle, composto por 413 indivíduos não afetados por FL/PNS, 267 (64,6%) foram do gênero feminino e 146 (35,4%) do masculino. A idade média foi de  $24,3 \pm 6,6$  anos e a cor de pele prevalente entre os indivíduos foi a feoderma (229 indivíduos, 55,4%), seguida pela leucoderma (157 indivíduos, 38%) e a melanoderma (27 indivíduos, 6,6%). As frequências do gênero e cor de pele entre os grupos foram estatisticamente diferentes.

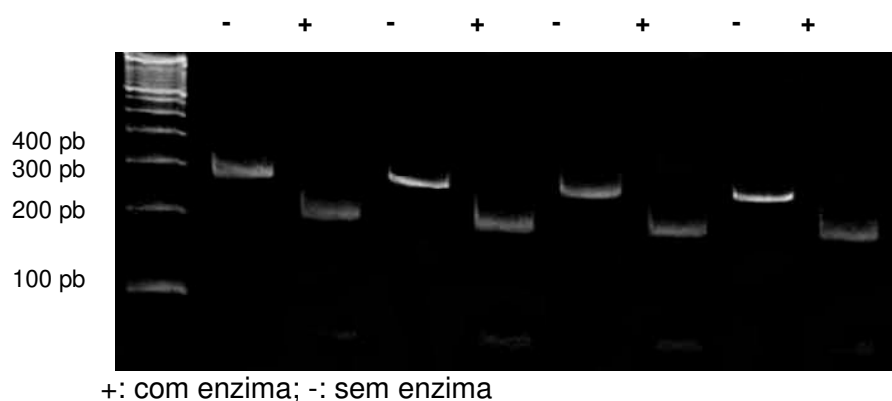
Tabela 4: Distribuição dos grupos quanto ao gênero, cor da pele e tipo de fissura.

	<b>Grupo Controle (n=413)</b>	<b>Grupo Caso (n=367)</b>	<b>p valor</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
<b>Gênero</b>			
Masculino	146 (35,4)	198 (54)	0,00001
Feminino	267 (64,6)	169 (46)	
<b>Cor de pele</b>			
Leucoderma	157 (38)	154 (42)	0,00001
Melanoderma	27 (6,6)	57 (15,5)	
Feoderma	229 (55,4)	156 (42,5)	
<b>Tipo de fissura</b>			
Fissura Labial		88 (24)	
Fissura Lábio-Palatina		198 (54)	
Fissura Palatina		81 (22)	

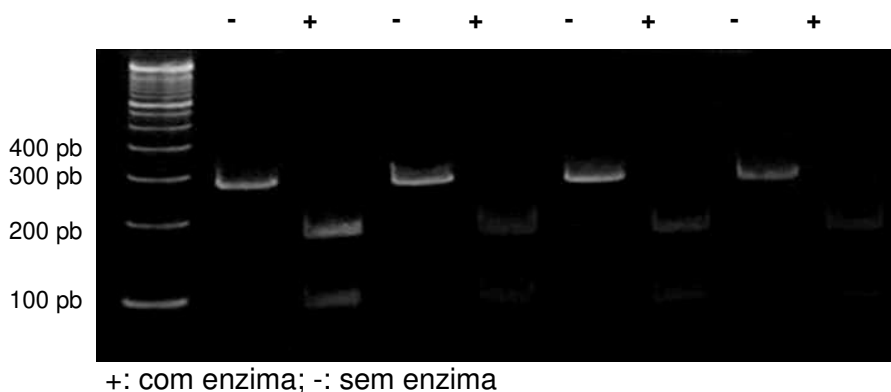
## 5.2. Frequencia Alélica e Genotípica dos Polimorfismos

Do total de 6 polimorfismos contidos nos genes relacionados ao desenvolvimento do lábio e/ou palato, que foram analisados neste estudo, apenas um foi confirmado: rs1057744 do gene *JAG2*. As demais regiões polimórficas não demonstraram variações na população estudada.

As figuras 1, 2, 3, 4 e 5 ilustram o padrão de fragmentação dos produtos de PCR após a digestão enzimática caracterizando os genótipos para os polimorfismos que não foram confirmados nessa população.

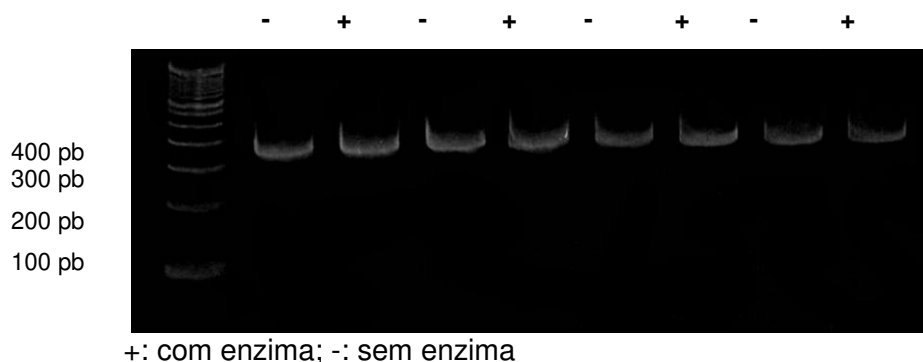


**Figura 1.** Amostras representativas do polimorfismo rs34019007 do gene *TGFβ3*. Os indivíduos GG para esse polimorfismo apresentaram 3 fragmentos: de 194, 63 e 19 pb. Os indivíduos GA apresentariam 4 fragmentos: 213, 194, 63 e 19 pb e indivíduos AA, dois fragmentos: 213 e 63 pb, após incubação com a endonuclease *DdeI*.

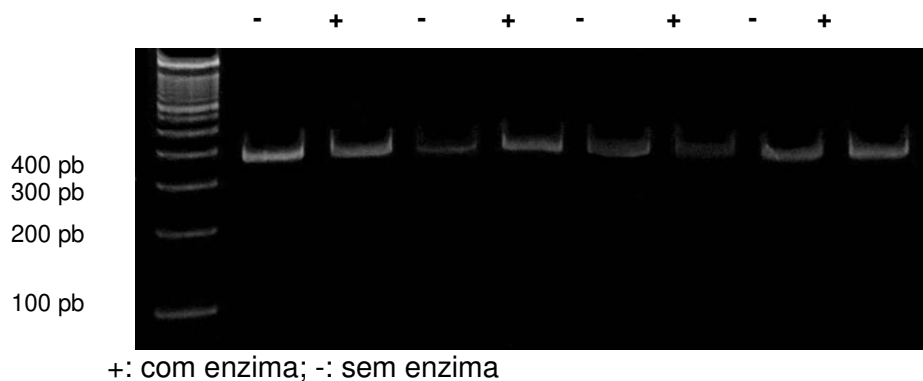


**Figura 2.** Amostras representativas do polimorfismo rs4252315 do gene *TGFβ3*. Os indivíduos CC para esse polimorfismo apresentaram 3 fragmentos: de 172, 92 e 12 pb. Os

indivíduos CT apresentariam 4 fragmentos: 264, 172, 92 e 12 pb e indivíduos TT, dois fragmentos : 264 e 12 pb, após incubação com a endonuclease *HpyCH4III*.



**Figura 3.** Amostras representativas do polimorfismo rs62636562 do gene *MSX1*. Os indivíduos CC apresentam apenas 1 fragmento de 366 pb. Os indivíduos CT apresentariam 3 fragmentos: 366, 228 e 138 pb e os indivíduos TT, 2 fragmentos: 228 e 138 pb, após incubação com a endonuclease *BsmAI*.



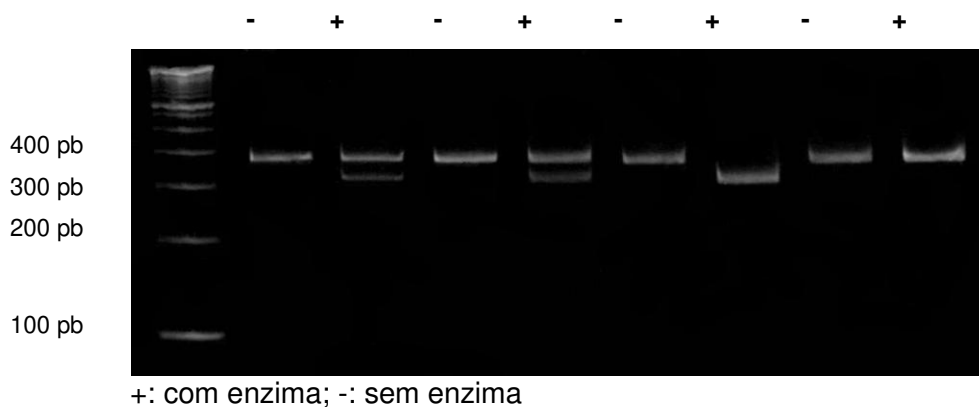
**Figura 4.** Amostras representativas do polimorfismo rs11549909 do gene *MYH9*. Os indivíduos GG apresentam apenas 1 fragmento de 372 pb. Os indivíduos GC apresentariam 3 fragmentos: 372, 206 e 166 pb e os indivíduos CC, 2 fragmentos: 206 e 166 pb, após incubação com a endonuclease *A/wNI*.



**Figura 5.** Amostras representativas do polimorfismo rs11549910 do gene *MYH9*. Os indivíduos GG apresentam fragmentos de 187, 90, 41, 24, 6 pb. Os indivíduos AG apresentariam 187, 163, 90, 41, 24 e 6 pb e os indivíduos AA, 163, 90, 41, 24 e 6 pb, após incubação com a endonuclease *BbvI*.

### 5.2.1 Polimorfismo rs1057744 no Gene *JAG2*

Os três genótipos possíveis do polimorfismo rs1057744 (c.1501 G>A), o qual resulta na substituição de um aminoácido glutamato por uma lisina (Glu501Lys), foram identificados na população brasileira deste estudo. A figura 6 ilustra o padrão de fragmentação dos produtos de PCR após a digestão enzimática pela endonuclease *BsmBI*, caracterizando os genótipos para o polimorfismo rs1057744 do gene *JAG2*, que foi confirmado nessa população.



**Figura 6.** Amostras representativas do polimorfismo rs1057744 do gene *JAG2*. Os indivíduos GG apresentam 2 fragmentos: 317 e 69 pb. Os indivíduos GA apresentam

fragmentos de 386, 317 e 69 pb. Os indivíduos AA apresentam apenas um fragmento de 386 pb, após incubação com a endonuclease *BsmBI*.

Para este locus polimórfico, o alelo A foi ligeiramente mais comum, sendo encontrado em 56,6% e 58,9% dos indivíduos do grupo controle e caso respectivamente, não sendo encontrada diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 5). A frequência dos genótipos no grupo controle para este polimorfismo estava de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência genotípica da região polimórfica rs1057744 indicou uma maior frequência do genótipo GA em ambos os grupos quando comparado com os genótipos GG e AA e com relação ao genótipo homocigoto, o genótipo AA foi mais comum tanto no grupo controle como no caso, sendo que não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos (Tabela 6). A análise em um modo dominante (AA vs GA+GG) também não mostrou diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Similarmente, a análise no modo recessivo (AA+GA vs GG) também não mostrou significância estatística (Tabela 6).

**Tabela 5.** Frequência alélica do polimorfismo rs1057744 no gene *JAG2* nos grupos controle e caso.

Polimorfismo	Grupo Controle (n=413)		Grupo Caso (n=367)		p valor
	n	%	n	%	
<b><i>JAG2</i></b>					
rs1057744					
Alelo A	318	56,6%	339	58,9%	0,36
Alelo G	416	43,4%	487	41,1%	

**Tabela 6.** Distribuição dos genótipos do polimorfismo no gene *JAG2* nos grupos controle e caso.

Polimorfismo	Grupo Controle (n=413)		Grupo Caso (n=367)		p valor
	n	%	n	%	
<b>rs1057744</b>					
<b>Modo Não-restrito</b>					
GG	74	17,9%	68	18,5%	0,49
GA	191	46,2%	182	49,5%	
AA	148	35,8%	117	31,8%	
<b>Modo Dominante</b>					
AA vs GA+GG					
GA+GG	265	64,1%	250	68,1%	0,24
AA	148	35,8%	117	31,8%	
<b>Modo Recessivo</b>					
AA+GA vs GG					
GG	74	17,9%	68	18,5%	0,82
GA+AA	339	82,08%	299	81,4%	

## 6. DISCUSSÃO

---

---

Com uma prevalência mundial significativa, as FL/P constituem os defeitos congênitos mais comuns da região craniofacial (Mossey & Litle, 2002). As cirurgias extensas, o envolvimento dentário, assim como potenciais sequelas psicológicas, ressaltam a importância dos estudos que investigam os fatores etiológicos envolvidos neste defeito facial (Lidral & Moreno, 2005). Não há dúvida de que investigações relativas às FL/P mostraram progressos significativos quanto à compreensão da sua etiologia genética, comparado com outros defeitos congênitos (Vieira, 2008). Inúmeras evidências indicam que as FL/PNS, como resultado da diversidade gênica, baixa penetrância e influência de vários fatores ambientais, são geneticamente complexas (revisado por Lidral *et al.*, 2008). Não existe um único gene associado às FL/PNS, sendo que vários *loci* foram correlacionados com a etiologia das FL/PNS (Field *et al.*, 2004; Marazita *et al.*, 2004; Koillinen *et al.*, 2005; Carinci *et al.*, 2007; Riley *et al.*, 2007b; Vieira *et al.*, 2008b; Birnbaum *et al.*, 2009; Grant *et al.*, 2009; Mangold *et al.*, 2009; Marazita *et al.*, 2009; Letra *et al.*, 2010; Mangold *et al.*, 2010). Embora ainda haja muito a ser investigado, a possibilidade de melhorar significativamente as estimativas de aconselhamento genético para FL/P está menos distante (Vieira, 2008).

Resultados notáveis com relação à etiologia das FL/P referem-se à demonstração de uma associação entre variações no locus *IRF6* e FL/P (Paranaíba *et al.*, 2009). Quando mutado, *IRF6* leva às síndromes de Van der Woude e pterígio poplíteo (OMIM 119300 e 119500, respectivamente), sendo condições que apresentam FL/P em seu espectro clínico (Kondo *et al.*, 2002). A associação entre *IRF6* e FL/P foi independentemente replicada em muitas populações (Vieira *et al.*, 2008b) e expandida para agenesia dentária isolada, uma outra característica fenotípica da síndrome de Van der Woude, e uma das anomalias congênitas mais comuns em humanos (Vieira *et al.*, 2007). É notável que o mesmo locus gênico pareça contribuir para fenótipos que variam desde formas muito raras de fissuras sindrômicas (frequência de 1 para 100.000 a



200.000 nascidos vivos) a formas isoladas de fissuras (frequencia de 1 a 500 a 2000) e até mesmo para fenótipo de agenesia dentária, que é muito comum (de frequencia de 1 a 10 para 100), sendo defeitos encontrados como parte de um mesmo espectro clínico (Vieira *et al.*, 2008b).

Estudos de ligação têm sugerido que vários loci podem ter um papel causal nas FL/Ps, incluindo as regiões nos cromossomos 1, 2, 4, 6, 14, 17 e 19. Entretanto, ainda há inconsistência entre os resultados, o que pode estar relacionado a um número reduzido de amostras dos estudos ou à heterogeneidade genética das populações estudadas. Alguns genes avaliados com relação à FL/P apresentam como produto fatores de crescimento (por exemplo, *TGF $\alpha$* , *TGF $\beta$ 3*), fatores de transcrição (por exemplo, *MSX1*, *IRF6*, *TBX22*), ou fatores que desempenham algum papel no metabolismo de xenobióticos ou metabolismo de nutrientes. As variantes mais intensamente investigadas envolvem os genes *TGF $\alpha$*  e *MTHFR* (revisado por Mossey *et al.*, 2009). Outro cenário importante nos estudos genéticos relacionados às FL/P é que a variação genética em mais de um gene parece ser necessária para causar FL/P. A formação de fissuras lábio-palatinas está diretamente associada a falhas nos processos que envolvem proliferação celular, diferenciação celular, adesão celular e apoptose e, em consequência, interações entre genes que controlam esses processos têm sido mostradas com relação às FL/P (Vieira *et al.*, 2008c) Evidências estatísticas de interação gene-gene tem sido relatada, por exemplo, entre os genes *MSX1* e *TGF $\beta$ 3* (Vieira *et al.*, 2003), assim como entre *MSX1* e *TGF $\alpha$*  (Jugessur *et al.*, 2003). Além disso, são investigadas as relações entre variações genéticas e alguns fatores ambientais, como fumo materno (Shi *et al.*, 2007) e ingestão de ácido fólico (Bufalino *et al.*, 2010).

No presente estudo foram analisados 6 polimorfismos contidos nos genes *TGF $\beta$ 3*, *MSX1*, *MYH9* e *JAG2*, relacionados à formação do lábio e/ou palato e que tem sido associados às FL/P. A amostra utilizada neste estudo pode ser considerada robusta, visto que cálculos de poder estatístico demonstraram que para a detecção de um efeito de 15%, o poder do estudo foi de aproximadamente

90%. Casos e controles não foram pareados e foram identificadas diferenças significantes em relação ao gênero e cor de pele dos indivíduos que formaram os grupos. Quanto ao gênero, a proporção entre masculino e feminino foi praticamente inversa, com o grupo caso apresentando mais homens e o grupo controle mais mulheres. A prevalência do gênero masculino no grupo caso era esperada pelo fato de que esse gênero é mais afetado pelas FL/PNS quando comparado com o feminino (Forrest & Merz, 2004; González *et al.*, 2008). A maior proporção do gênero feminino no grupo controle pode estar relacionada ao maior número de mulheres que procuraram por atendimento odontológico convencional das clínicas de odontologia, fato este observado em estudos prévios (Abbud *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2009; Aquino *et al.*, 2010). A população brasileira pode ser considerada uma das mais heterogêneas do mundo, sendo representada por uma miscigenação étnica de euro-brasileiros (colonizadores espanhóis e portugueses, principalmente), afro-brasileiros e ameríndios, o que torna muito difícil caracterizar a etnicidade dos indivíduos (Vieira *et al.*, 2002; Bertoja *et al.*, 2008). Em adição, existem evidências que cor de pele não é um indicador muito seguro de raça na população brasileira (Parra *et al.*, 2004; Estrela *et al.*, 2008).

Um dos genes que tem sido relacionado à etiologia das FL/PNS é Fator de Crescimento Transformador Beta 3 (*TGFβ3*), importante componente na fusão palatina (Nogai *et al.*, 2008). Estudos de caso-controle e/ou trios (afetados e pais) avaliaram polimorfismos no gene *TGFβ3* e relataram associações positivas (Romitti *et al.*, 1999; Jugessur *et al.*, 2003; Ichikawa *et al.*, 2006). No presente estudo, foram avaliados dois polimorfismos não-sinônimos do gene *TGFβ3*: rs34019007, que gera a substituição do aminoácido prolina por uma leucina (Pro57Leu), e rs4252315, em que o aminoácido treonina é substituído por uma metionina (Thr60Met). Esses polimorfismos estão localizados dentro da região N-terminal e compreende parte da estrutura de  $\alpha$ -hélice da proteína. Embora não existam estudos demonstrando a funcionabilidade desses polimorfismos, a presença do nucleotídeo variante é preditivo de uma alteração neste sítio. Em adição, observa-se uma alteração no perfil hidrofóbico da proteína na presença do

aminoácido polimórfico, ou seja, algum efeito significativo na função protéica poderia ser esperado. A literatura não apresenta informações quanto à correlação destes polimorfismos com as FL/PNS. Neste trabalho, a presença de ambos os polimorfismos avaliados no gene *TGFβ3* não foi confirmada.

Romitti e colaboradores (1999) relataram um risco aumentado para FL/PNS (OR= 2,1 95%, CI: 1,0-4,4) associado ao alelo raro A3 da região de repetição CA no gene *TGFβ3* (*TGFβ3*-CA). Jugessur e colaboradores (2003) avaliaram essa mesma região e encontraram que crianças com duas cópias de alelos variantes tiveram um risco aproximadamente sete vezes maior para FL/PNS. Zhu e colaboradores (2010), em estudo similar, observaram que comparadas às crianças com o genótipo homocigoto do tipo selvagem, aquelas com alelos variantes apresentaram, de forma consistente, maior risco de FL/PNS. O polimorfismo rs2300607 foi relacionado às FL/PNS em uma população japonesa (Ichikawa *et al.*, 2006), e confirmado também em fissurados provenientes da Europa Central (Reutter *et al.*, 2008). Entretanto, indícios definitivos do envolvimento do gene *TGFβ3* no desenvolvimento de fissuras em humanos permanecem inconclusivos, uma vez que, apesar dos relatos positivos (Mitchell *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2001; Beaty *et al.*, 2002; Scapoli *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Slayton *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004), há trabalhos que mostram ausência de associações do *TGFβ3* em diferentes populações de FL/PNS, sendo alguns estudos com metodologia similar e em polimorfismos já relacionados a um maior risco para FL/P em outros trabalhos (Lidral *et al.*, 1998; Tanabe *et al.*, 2000; Beaty *et al.*, 2001; Morkūniene *et al.*, 2007).

No presente estudo, avaliou-se também a presença do polimorfismo rs62636562 do gene *MSX1*. O gene *MSX1* emergiu como um forte candidato para FL/PNS a partir de estudos de associação realizados em populações de origens étnicas diferentes (Vieira, 2008). Um sequenciamento do gene *MSX1* revelou diversas mutações e estima-se que cerca de 2% dos pacientes com FL/PNS apresentam mutações nesse gene (Jezewski *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004). Alguns estudos indicam o gene *MSX1* como um fator de risco para FL/PNS (Lidral

*et al.*, 1998; Romitti *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 2001; Beaty *et al.*, 2002) baseados em modelos animais (Satokata e Maas, 1994) e estudos de desequilíbrio de ligação (Lidral *et al.*, 1998; Beaty *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2001). Trabalho realizado por van der Boogaard e colaboradores (2000) mostrou uma família afetada por uma forma autossômica dominante de FL/PNS, em que uma mutação *nonsense* no gene *MSX1* foi encontrada. Outros trabalhos relacionam a presença de polimorfismos numa região intrônica de repetição CA com FL/PNS (Park *et al.*, 2007). Além disso, *MSX1* é comumente excluído em casos de síndrome 4p-/Wolf-Hirschhorn, em que FL/P é uma característica comum (Battaglia *et al.*, 2001) O polimorfismo do gene *MSX1* aqui avaliado, resulta na substituição do aminoácido alanina por leucina (Ala273Leu), sendo posicionado próximo a um domínio homeobox e em uma região susceptível a mutações no gene *MSX1*. Não há dados referentes à frequência desse polimorfismo em diferentes populações ou de sua associação com FL/PNS. Assim como os polimorfismos avaliados no gene *TGFβ3*, esse polimorfismo não foi confirmado na população brasileira do presente trabalho.

Estudo realizado por Park e colaboradores (2007) numa população coreana avaliou 14 polimorfismos identificados próximos ou no gene *MSX1*, em regiões funcionalmente importantes. Desses, apenas um polimorfismo localizado no éxon 2 mostrou associação significativa com FP, FL e FLP. Além das análises de variações genéticas no gene *MSX1* com relação a maior risco de FL/P, potenciais interações gene-gene e interações gene-ambiente têm sido avaliadas. Beaty e colaboradores (2002) relataram evidências de interação entre uma região de repetição CA no gene *MSX1*, tabagismo materno durante o primeiro trimestre de gestação com aumento no risco de FL/PNS. De maneira similar, Fallin e colaboradores (2003) avaliaram oito polimorfismos presentes numa região de repetição CA em 206 casos de FL/PNS e respectivos pais dos afetados. As avaliações de marcador único e testes de desequilíbrio de transmissão baseado em haplótipo relacionaram esse gene a um aumento no risco de FL/P, particularmente para FP. Neste estudo, observou-se ainda uma associação entre

haplótipos no *MSX1* e exposição ao tabagismo materno, durante o primeiro trimestre de gestação. Suazo e colaboradores (2010) analisaram cinco polimorfismos no gene *MSX1* (rs6446693; c.425g>T; c.35G>A; rs3775261 e rs12532), localizados 6,3 Kb a montante da região 3' não traduzida (UTR) em uma amostra de 150 trios (afetado por FL/PNS e pais). Quatro haplótipos mostraram transmissão de pais para descendentes afetados, mas não dos polimorfismos individualmente. Além disso, o alelo A do polimorfismo rs12532 mostrou um aumento no risco para FL/PNS de 2,08 vezes, quando herdado do pai (95% CI: 1,10-4,02; p = 0,025). Interessantemente, Jagomägi e colaboradores (2010) mostraram uma associação estatisticamente significativa do polimorfismo rs6446693, no gene *MSX1*, em uma população da Estônia (153 casos de FL/PNS e 205 controles).

Um terceiro gene, *MYH9*, também foi avaliado neste estudo. Dois polimorfismos adjacentes nesse gene, localizados no domínio conservado *coiled-coiled* e próximos a regiões susceptíveis a mutações foram avaliados: rs11549910, que resulta na substituição de um aminoácido glutamina por arginina (Gln1532Arg), e rs11549909, em que o aminoácido valina é substituído por uma leucina (Val1534Leu). Não há dados sobre a diversidade populacional dos polimorfismos selecionados neste trabalho, sendo que na população brasileira desse estudo, a presença dos polimorfismos rs11549910 e rs11549909 não foram confirmadas. Como descrito anteriormente, esse gene é altamente expresso nos processos palatinos durante a fusão do palato (Marigo *et al.*, 2004). Um estudo revelou que a proteína *MYH9* foi abundantemente expressa na *MEE* antes da fusão palatina e, após a formação da *MES*, sua expressão continuou alta, porém limitada às células epiteliais. Com a fusão concluída, a sua expressão já não era detectada. Esses dados sugerem que esse gene pode desempenhar um papel importante durante o desenvolvimento do palato (Martinelli *et al.*, 2007).

Baseados nesse contexto, Martinelli e colaboradores (2007) propuseram investigar uma possível associação entre *MYH9* e FL/P em 218 casos de FL/P e respectivos pais, provenientes da Itália. Para isso, avaliaram oito polimorfismos,

escolhidos por se encontrarem em éxons e/ou por uma possível alteração na função protéica. Similarmente, estudo realizado por Birnbaum e colaboradores (2009) em 248 trios, com ascendência proveniente da Europa Central (Alemanha e países vizinhos), avaliou sete (rs5995288, rs739097, rs2071731, rs1002246, rs3752462, rs2009930 e rs7078) dos oito polimorfismos analisados por Martinelli e colaboradores (2007). Resultados significantes foram obtidos através da análise de desequilíbrio de ligação entre os marcadores rs739097 e rs2071731 e entre rs3752462 e rs2009930, similar aos resultados encontrados por Martinelli e colaboradores (2007). Outro estudo envolvendo nove famílias caucasianas e uma família afro-americana mostrou evidências de uma transmissão alterada em quatro polimorfismos do gene *MYH9* ( $p < 0.01$ ), como o polimorfismo rs1002246, que mostrou transmissão alterada em todos os métodos de análise realizados no estudo (Chiquet *et al.*, 2009). Os três estudos citados consideraram o gene *MYH9* como tendo um importante papel causal no desenvolvimento de FL/PNS. Entretanto, o estudo italiano (Martinelli *et al.*, 2007) encontrou maior associação com o polimorfismo rs3752462 e o estudo americano com o polimorfismo rs1002246. Além disso, o estudo realizado por Birnbaum e colaboradores (2009b) verificou uma distorção significativa de transmissão do polimorfismo rs7078, uma variante que não mostrou transmissão alterada nos outros dois estudos citados.

Além dos genes *TGF $\beta$ 3*, *MSX1* e *MYH9*, foi avaliado o polimorfismo rs1057744 do gene *JAG2*, sendo o único confirmado na população do presente estudo. O gene *JAG2* tem sido relacionado às FL/PNS em estudos com modelo animal, os quais mostraram que camundongos deficientes em *JAG2*, que codifica uma ligante de superfície celular para os receptores da família *Notch1*, apresentam fissura de palato associada a fusões do palato com a língua (Casey *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010). Em humanos, algumas evidências de envolvimento desse gene em FL/PNS foram obtidas a partir de análises de haplótipos, testes globais e análises de marcador único (Scapoli *et al.*, 2008). O polimorfismo não-sinônimo rs1057744 resulta na substituição de um aminoácido glutamato por uma lisina na posição 1501 do produto protéico (Glu501Lys). A presença do

nucleotídeo variante A é preditivo para um encurtamento da isoforma protéica. Assim, um efeito significativo na função da proteína é esperado. Apesar de ter sido demonstrada uma associação desse polimorfismo com FL/PNS em outros estudos (Vieira *et al.*, 2005; Neiswanger *et al.*, 2006; Scapoli *et al.*, 2008), os resultados do presente trabalho não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre o grupo caso e grupo controle, tanto nas avaliações dos alelos separadamente, quanto dos genótipos na forma recessiva ou dominante. A frequência dos alelos e dos genótipos desse polimorfismo em outras populações é variável. Na população europeia, ambos os alelos A e G apresentam frequência de 50%. Já na população africana (sub-saariana), o alelo A apresenta frequência de 100%, enquanto que na asiática, o alelo G tem frequência de aproximadamente 63%. Nesse estudo, o genótipo GA foi predominante (~48%), assim como na população europeia (~46%) e asiática (50%), embora o genótipo AA seja predominante na África Sub-saariana (~81%) (GeneBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Estudo realizado por Vieira e colaboradores (2003) analisou mutações em genes candidatos para FL/P em 91 pacientes provenientes das Filipinas e 91, de Iowa (Estados Unidos). Estudos de desequilíbrio de ligação foram realizadas para os genes *GLI2*, *JAG2*, *MSX2*, *SATB2*, *SPRY2*, *SKI*, e *TBX10*. A análise de haplótipos demonstrou associações entre *MSX2* e população das Filipinas ( $p=0,001$ ) e Iowa ( $p = 0,008$ ); entre *JAG2* e os filipinos ( $p = 0,004$ ); entre as duas populações e o gene *SATB2* ( $p = 0,03$ ) e entre *TBX10* ( $p = 0,04$ ) na população de Iowa. Scapoli e colaboradores (2008) investigaram a associação do gene *JAG2* em uma amostra de 239 pacientes italianos afetados por FL/PNS e seus pais. Estudo de haplótipos revelou uma associação significativa para o *JAG2* quando análise de dois polimorfismos (rs1057744 e rs909236;  $p = 0,01$ ) e três polimorfismos (rs2238287, rs1057744 e rs909236;  $p= 0,02$ ) foram realizadas. Em conjunto, os resultados desses trabalhos indicam que o gene *JAG2* pode estar envolvido na etiologia das FL/PNS em diferentes populações. Os dados mais significativos nos estudos que avaliam a participação desse gene em FL/P são relacionados ao polimorfismo não-sinônimo rs1057744. Em contraste com os

estudos citados, e apesar de confirmada a presença do polimorfismo, não foi observada a sua associação com FL/PNS na população brasileira dessa investigação. O polimorfismo rs1057744 pode ser considerado um importante candidato para FL/PNS em outras populações, entretanto isso não exclui a possibilidade de que outras mutações, em desequilíbrio de ligação com esse polimorfismo, estejam relacionadas às FL/PNS, hipótese que poderá ser mais explorada em estudos funcionais (Scapoli *et al.*, 2008).



## 7. CONCLUSÕES

---

---

1. Cinco dos polimorfismos em potencial deste estudo, rs34019007 e rs4252315, do gene *TGF $\beta$ 3*, rs62636562, do gene *MSX1*, rs11549910 e rs11549909, do gene *MYH9* não foram confirmados nos pacientes avaliados neste estudo;
2. Os presentes resultados revelaram que os três genótipos possíveis do polimorfismo rs1057744 do gene *JAG2* foram identificados na população brasileira estudada.
3. No polimorfismo rs1057744 do gene *JAG2*, o alelo A foi mais comum. Entretanto sem diferença estatística significativa entre os grupos. A frequência genotípica da região polimórfica rs1057744 indicou uma maior frequência do genótipo GA em ambos os grupos. Apesar de confirmado, o polimorfismo rs1057744 não apresentou nenhuma associação significativa com fissura lábio-palatina não síndrômica na população brasileira do presente trabalho.

## 8. REFERÊNCIAS\*

---

---

- Abbud R, Ferreira LA; Campos AG, Zanin KEG. Clinical emergency service: study of the services offered in ten years. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2002; 56(4):271-275.
- Amidei RL, Hamman RF, Kassebaum DK, Marshall JA. Birth prevalence of cleft lip and palate in Colorado by sex distribution, seasonality, race/ethnicity, and geographic variation. *Spec Care Dentist.* 1994; 14:233-240.
- Antony AC. In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(2): 598-603.
- Aquino SN, Paranaíba LMR, Martelli DRB, Swerts MSO, Barros L M, Bonan PRF *et al.* Study of patients with cleft lip and palate with consanguineous parents. *BJORL.* 2011; 77(1): 19-22
- Aquino, SN; Martelli, DRB; Laranjeira, AL; Bonan, PRF; Martelli-Junior, H. Concordância entre diagnóstico clínico e histopatológico de lesões bucais. *RGO.* 2010; 58 (3): 345-349.
- Ardinger HH, Buetowj KH, Bell G, Bardacht J, VanDemark DR, Murray JC. Association of Genetic Variation of the Transforming Growth Factor-Alpha Gene with Cleft Lip and Palate. *Am J Hum Genet.* 1989; 45:348-353.
- Barrow LL, van Bokhoven H, Daack-Hirsch S, Andersen T, van Beersum SE, Gorlin R *et al.* Analysis of the p63 gene in classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts. *J Med Genet.* 2002; 39(8): 559-566.
- Battaglia A, Carey JC, Wright TJ. Wolf-Hirschhorn (4p-)syndrome. *Adv Pediatr.* 2001; 48:75-113.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB, Fan YT, Zeiger JS, Liang KY *et al.* A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Ann Epidemiol.* 2001; 11:434–442.
- Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk CA, McIntosh I. Testing candidate genes for nonsyndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genet Epidemiol.* 2002; 22:1–11.
- Bellis TH, Wohlgemuth B. The incidence of cleft lip and palate deformities in the south-east of Scotland (1971-1990). *Br J Orthod.* 1999; 26(2): 121-125.
- Bertoja EA, Alho CS, De França E, Menegotto B, Robinson WM. TGF $\alpha$ /TAQ I polymorphism in nonsyndromic cleft lip and palate patients from Rio Grande Do Sul, Brazil. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008; 45(5): 539-544.
- Bille C, Winther JF, Bautz A, Murray JC, Olsen J, Christensen K. Cancer risk in persons with oral cleft - a population-based study of 8.093 cases. *Am J Epidemiol.* 2005; 161: 1047-1055.
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M *et al.* Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2009; 41: 473-477.
- Birnbaum S, Reutter H, Mende M, de Assis NA, Diaz-Lacava A, Herms S *et al.* Further evidence for the involvement of MYH9 in the etiology of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci.* 2009b; 117: 200–203.
- Blanco R, Chakraborty R, Barton SA, Carreno H, Paredes M, Jara L *et al.* Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. *Hum Biol.* 2001; 73:81-89.
- Blanco-Davila F. Incidence of cleft lip and palate in the northeast of Mexico: a 10-year study. *J Craniofac Surg.* 2003; 14(4): 533-537.
- Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A.* 2005; 137A (3): 259-262.

- Blavier L, Lazaryev A, Grofen J, Heisterkamp N, Declerck YA, Kaartinen V. TGF- $\beta$ 3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell*. 2001; 12:1457–1466.
- Bliiek BJ, van Schaik RH, van der Heiden IP, Sayed-Tabatabaei FA, van Duijn CM, Steegers EA *et al*. Maternal medication use, carriership of the ABCB1 3435C > T polymorphism and the risk of a child with cleft lip with or without cleft palate. *Am J Med Genet A*. 2009; 149A (10): 2088-2092.
- Blin-Wakkach C, Lezot F, Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Monteiro S, Teillaud C *et al*. Endogenous MSX1 antisense transcript: In vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 7336-7341.
- Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(9): 724-731.
- Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM *et al*. Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A (4): 440-449.
- Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Shi M, Weinberg CR, Meyer K *et al*. Oral facial clefts and gene polymorphisms in metabolism of folate/one-carbon and vitamin A: a pathway-wide association study. *Genet Epidemiol*. 2009; 33(3): 247-255.
- Braybrook C, Doudney K, Marcano AC, Arnason A, Bjornsson A, Patton MA *et al*. The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Nat Genet*. 2001; 29:179-178.
- Brett TC, Syed SH, Robin H, Amber B, John BM, Samuel S *et al*. Genomic screening identifies novel linkages and provides further evidence for a role of MYH9 in nonsyndromic cleft lip and palate. *Eur J Hum Genet*. 2008; 149: 1-10.
- Brewer C, Holloway S, Zawalynski P, Schinzel A, Fitz-Patrick D. A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo-

- and triplolethality - and tolerance of segmental aneuploidy - in humans. *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 1702-1708.
- Briggs RM. Vitamin supplementation as a possible factor in the incidence of cleft lip/palate deformities in humans. *Clin Plast Surg.* 1976; 3: 647-652.
  - Broder HL, Richman LC, Matheson PB. Learning disability, school achievement, and grade retention among children with cleft: a two-center study. *Cleft Palate Craniofac J.* 1998; 35(2):127-131.
  - Bufalino A, Paranaíba LMR, Aquino SN, Martelli-Júnior H, Swerts MSO, Coletta RD. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. 2010; 88(11):980-986.
  - Calzolari E, Milan M, Cavazzuti GB, Cocchi G, Gandini E, Mangnani C *et al.* Epidemiological and genetic study of 200 cases of oral cleft in Emilia Romagna Region of Northern Italy. *Teratology.* 1988; 38: 559-564.
  - Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2007; 71(10): 1509-1519.
  - Carroll N, Pangilinan F, Molloy AM, Troendle J, Mills JL, Kirke PN *et al.* Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. *Hum Genet.* 2009; 125(3): 247-256.
  - Casey LM, Lan Y, Cho ES, Maltby KM, Gridley T, Jiang R. Jag2-Notch1 signaling regulates oral epithelial differentiation and palate development. *Dev Dyn.* 2006; 235(7): 1830-1844.
  - Cedergren M, Källén B. Maternal obesity and the risk for orofacial clefts in the offspring. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005; 42(4): 367-371.
  - Chevrier C, Perret C, Bahuau M, Nelva A, Herman C, Francannet C *et al.* Interaction between the ADH1C polymorphism and maternal alcohol intake in the risk of nonsyndromic oral clefts: an evaluation of the contribution of child and maternal genotypes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005; 73(2): 114-122.

- Chevrier C, Bahuaui M, Perret C, Iovannisci DM, Nelva A, Herman C *et al.* Genetic susceptibilities in the association between maternal exposure to tobacco smoke and the risk of nonsyndromic oral cleft. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A (18): 2396-2406.
- Chiquet BT, Lidral AC, Stal S, Mulliken JB, Moreno LM, Arcos-Burgos M, Valencia-Ramirez C, Blanton SH, Hecht JT. CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 2241– 2248.
- Chiquet BT, Hasmil SS, Henry R, Burt A, Mullikens JB, Stal S *et al.* Genomic screening identifies novel linkages and provides further evidence for a role of MYH9 in nonsyndromic cleft lip and palate. *European Journal of Human Genetics.* 2009; 17, 195–204.
- Choi KY, Kim HJ, Cho BC, Kim IS, Kim HJ, Ryou HM. A TGF- $\beta$ -Induced Gene, big-h3, is crucial for the apoptotic disappearance of the Medial Edge Epithelium in palate fusion. *J Cell Biochem.* 2009; 107:818–825.
- Christensen K. The 20th century Danish facial cleft population-epidemiological and genetic-epidemiological studies. *Cleft Palate Craniofac J.* 1999; 36:96-104.
- Christensen K, Mortensen PB. Facial clefting and psychiatric diseases: a follow-up of the Danish 1936-1987 Facial Cleft cohort. *Cleft Palate Craniofac J.* 2002; 39: 392-396.
- 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; 328: 1405.
- Cooper ME, Stone RA, Liu Y, Hu DN, Melnick M, Marazita ML. Descriptive epidemiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Shanghai, China, from 1980 to 1989. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37(3): 274-280.
- Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarova MM. Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983–1992. *Am J Med Genet.* 1998; 79: 42–47.

- Cui XM, Shiomi N, Chen J, Saito T, Yamamoto T, Ito Y, Bringas P, Chai Y, Shuler CF. Overexpression of Smad2 in Tgf-beta3-null mutant mice rescues cleft palate. *Dev Biol.* 2005; 278:193–202.
- Curtis EJ, Fraser FC, Warburton D. Congenital cleft lip and palate. *Am J Dis Child.* 1961; 102: 853-857.
- Czeizel AE. Controlled studies of multivitamin supplementation on pregnancy outcomes. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 678: 266-275.
- DeRoo LA, Wilcox AJ, Drevon CA, Lie RT. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 2008; 168(6): 638-646.
- Ding H, Wu X, Boström H, Kim I, Wong N, Tsoi B *et al.* A specific requirement for PDGF-C in palate formation and PDGFR-alpha signaling. *Nat Genet.* 2004; 36: 1111–1116.
- Dudas M, Nagy A, Laping NJ, Moustakas A, Kaartinen V. Tgf-beta3-induced palatal fusion is mediated by Alk-5/Smad pathway. *Dev Biol.* 2004; 266:96–108.
- Dudas M, Li WY, Kim J, Yan A, Kaartinen V. Palatal fusion - Where do the midline cells go? A review on cleft palate, a major human birth defect. *Acta histochemica.* 2007; 109:1-14.
- Elliot RF, Jovic G, Beveridge M. Seasonal Variation and Regional Distribution of Cleft Lip and Palate in Zambia. *Cleft Palate Craniofac J* 2006; 45:215-218.
- Estrela RC, Ribeiro FS, Carvalho RS, Gregório SP, Dias-Neto E, Struchiner CJ *et al.* Distribution of ABCB1 polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics.* 2008; 9(3): 267-276.
- Fallin MD, Hetmanski JB, Park J, Scott AF, Ingersoll R, Fuernkranz HA *et al.* Family-based analysis of MSX1 haplotypes for association with oral clefts. *Genet Epidemiol.* 2003; 25: 168–175.

- Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G\*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods*. 2009; 41: 1149-1160.
- Field LL, Ray AK, Cooper ME, Goldstein T, Shaw DF, Marazita ML. Genome Scan for Loci Involved in Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Families From West Bengal, India. *Am J Med Genet A*. 2004; 130A(3): 265-271.
- Fogh-Andersen P. Inheritance of harelip and cleft palate, Busck, Copenhagen, 1942.
- Forrester MB, Merz RD. Descriptive epidemiology of oral clefts in a multiethnic population, Hawaii, 1986-2000. *Cleft Palate Craniofac J*. 2004; 41(6):622-628.
- Fraser FC, Gwyn A. Seasonal variation in birth date of children with cleft lip. *Teratology*. 1998; 57:93-95.
- Freitas JA, Dalben GS, Santamaria M, Júnior Freitas PZ. Current data on the characterization of oral clefts in Brazil. *Braz Oral Res*. 2004; 18(2): 128-133.
- Frebourg T, Oliveira C, Hochain P, Karam R, Manouvrier S, Graziadio C *et al*. Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *J Med Genet*. 2006; 43: 138-142.
- Froster-Iskenius UG. Popliteal pterygium syndrome. *J Med Genet*. 1990; 27: 320-326.
- Garcia AM. Occupational exposure to pesticides and congenital malformations: a review of mechanisms, methods, and results. *Am J Ind Med*. 1998; 33: 232-240.
- Gato A, Martinez ML, Tudela C, Alonso I, Moro A, Formoso MA *et al*. TGF- $\beta$ 3-induced chondroitin sulphate proteoglycan mediates palatal shelf adhesion. *Dev Biol*. 2002; 250:393–405.
- Ghassibe M, Bayet B, Revencu N, Verellen-Dumoulin C, Gillerot Y, Vanwijck R *et al*. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft



- lip with or without cleft palate in the Belgian population. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13(11): 1239-1242.
- Gong SG, Gong TW, Shum L. Identification of markers of the midface. *J Dent Res.* 2005; 84: 69–72.
  - González BS, López ML, Rico MA, Garduño F. Oral clefts: a retrospective study of prevalence and predisposal factors in the State of Mexico. *J Oral Sci.* 2008; 50(2): 123-129.
  - Gorlin R, Cohen M, Hennekam R. *Syndromes of the head and neck.* 4. ed. New York: Oxford University Press; 2001.
  - Grant SF, Wang K, Zhang H, Glaberson W, Annaiah K, Kim CE *et al.* A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr.* 2009; 155: 909-913.
  - Gregg TA, Leonard MB, Hayden MA, Coyle CF. Birth Prevalence of Cleft Lip and Palate in Northern Ireland (1981 to 2000). *Cleft Palate Craniof J.* 2008; 45:141-147.
  - Harville EW, Wilcox AG, Lie RT, Vindenes H, Abyholm F. Cleft lip and palate versus cleft lip only: Are they distinct defects? *Am J Epidemiol.* 2005; 162: 448-453.
  - Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozenfeld-Granot G, Carlsson LE, Savige J *et al.* Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May–Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet.* 2001; 69: 1033–1045.
  - Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med.* 2000; 343(22): 1608-1614.
  - Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, Brown KK, Bruns GA, Donovan DJ *et al.* Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. *Am J Hum Genet.* 2008; 82: 712–722.

- Hill RE, Jones PF, Rees AR, Sime CM, Justice MJ, Copeland NG *et al.* A new family of mouse homeo box-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1. *Genes Dev.* 1989; 3: 26-37.
- Honein MA, Rasmussen SA, Reefhuis J, Romitti PA, Lammer EJ, Sun L *et al.* Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology.* 2007; 18: 226-233.
- Ichikawa E, Watanabe A, Nakano Y, Akita S, Hirano A, Kinoshita A *et al.* PAX9 and TGF $\beta$ 3 are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analyses. *J Hum Genet.* 2006; 51(1): 38-46.
- Ingersoll RG, Hetmanski J, Park JW, Fallin D, McIntosh I, Wu-Chou YH *et al.* Association between genes on chromosome 4p16 and non-syndromic oral clefts in four populations. *Eur J Hum Genet.* 2010 Jun;18(6):726-732.
- Ito Y, Yeo JY, Chytil A, Han J, Bringas PJ, Nakajima A *et al.* Conditional inactivation of Tgfbr2 in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development.* 2003; 130:5269– 5280.
- Ivens A, Flavin A, Williamson R, Dixon M, Bates G, Buckingham M *et al.* The human *homeobox* gene *HOX7* maps to chromosome 4p16.1 and may be implicated in Wolf-Hirschorn syndrome. *Hum. Genet.* 1990; 84: 473-476.
- Jagomägi T, Nikopensius T, Krjutskov K, Tammekivi V, Viltrop T, Saag M *et al.* MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118: 213–220.
- Jamilian A, Nayeri F, Babayan A. Incidence of cleft lip and palate in Tehran. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2007; 25(4): 174-176.
- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE *et al.* Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2003; 40: 399-407.

- Jia ZL, Li Y, Li L, Wu J, Zhu LY, Yang C *et al.* Association among IRF6 polymorphism, environmental factors, and nonsyndromic orofacial clefts in western china. *DNA Cell Biol.* 2009; 28(5): 249-257.
- Jiang R, Lan Y, Chapman HD, Shawber C, Norton CR, Serreze DV *et al.* Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev.* 1998;12: 1046–1057
- Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn.* 2006; 235: 1152–1166.
- Jianyan L, Zeqiang G, Yongjuan C, Kaihong D, Bing D, Rongsheng L. Analysis of interactions between genetic variants of BMP4 and environmental factors with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate susceptibility. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 39(1): 50-56.
- Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol.* 2008; 37: 1041-1058.
- Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD *et al.* Variants of developmental genes (TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ 3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol.* 2003; 24:230–239.
- Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15: 270-278.
- Jugessur A, Rahimov F, Lie RT, Wilcox AJ, Gjessing HK, Nilsen RM *et al.* Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway. *Genet Epidemiol.* 2008; 32(5): 413-424.
- Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Diseases.* 2009; 15: 437-453.
- Juriloff DM, Harris MJ. Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008; 82: 63–77.

- Kanaan ZM, Mahfouz R, Tamim H. The prevalence of consanguineous marriages in an underserved area in Lebanon and its association with congenital anomalies. *Genet Test*. 2008; 12(3): 367-372.
- Kim MH, Kim HJ, Choi JY, Nahm DS. Transforming growth factor-beta3 gene SfaN1 polymorphism in Korean nonsyndromic cleft lip and palate patients. *J Biochem Mol Biol*. 2003; 36:533–537.
- Kim SH, Hu Y, Cadman S, Bouloux P. Diversity in fibroblast growth factor receptor 1 regulation: learning from the investigation of Kallmann syndrome. *J Neuroendocrinol*. 2008; 20(2): 141-163.
- Kistner EO, Shi M, Weinberg CR. Using cases and parents to study multiplicative gene-by-environment interaction. *Am J Epidemiol*. 2009; 170(3): 393-400.
- Koillinen H, Lahermo P, Rautio J, Hukki J, Peyrard-Janvid M, Kere J. A genome-wide scan of nonsyndromic cleft palate only (CPO) in Finnish multiplex families. *J Med Genet*. 2005; 42: 177-184.
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y *et al*. Mutation in IRF6 cause van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet*. 2002; 32: 285-289.
- Krapels IP, van Rooij IA, Ocké MC, West CE, van der Horst CM, Steegers-Theunissen RP. Maternal nutritional status and the risk for orofacial cleft offspring in humans. *J Nutr*. 2004; 134(11): 3106-3113.
- Krapels IP, Vermeij-Keers C, Muller M, de Klein A, Steegers-Theunissen RP. Nutrition and genes in the development of orofacial clefting. *Nutr Rev*. 2006; 64(6): 280-288.
- Krost B, Schubert J. Influence of season on prevalence of cleft lip and palate. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 35:215-218.
- Leck I, Lancashire RJ. Birth prevalence of malformations in members of different ethnic groups and in the off spring of matings between them in Birmingham, England. *J Epidemiol Community Health*. 1995; 49: 171–179.

- Leite IC, Paumgartten FJR, Koifman S. Chemical exposure during pregnancy and oral clefts in newborns. *Cad. Saúde Pública*. 2002; 18(1): 17- 31.
- Leite IC, Paumgartten FJR, Koifman S. Fendas orofaciais no recém-nascido e o uso de medicamentos e condições de saúde materna: estudo caso-controle na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Ver Bras Saúde Matern Infant*. Recife 2005; 5 (1): 35-43.
- Leite IC, Koifman S. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz Oral Res*. 2009; 23(1): 31-37.
- Letra A, Menezes R, Fonseca RF, Govil M, McHenry T, Murphy MJ *et al*. Novel Cleft Susceptibility Genes in Chromosome 6q. *J Dent Res*. 2010; 89(9):927-932.
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S *et al*. Association of *MSX1* and *TGFβ3* with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet*. 1998; 63:557-568.
- Lidral AC, Murray JC. Genetic approaches to identify disease genes for birth defects with cleft lip/palate as a model. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2004; 70: 893–901.
- Lidral AC, Moreno LM. Progress toward discerning the genetics of cleft lip. *Curr Opin Pediatr*. 2005; 17: 731–739.
- Lidral AC, Moreno LM, Bullard SA. Genetic Factors and Orofacial Clefting. *Semin Orthod*. 2008; 14(2): 103-114.
- Lie RT, Wilcox AJ, Skjaerven R. A population-based study of the risk of recurrence of birth defects. *N Engl J Med*. 1994; 331(1): 1-4.
- Lie RT, Wilcox AJ, Taylor J, Gjessing HK, Saugstad OD, Aabyholm F *et al*. Maternal smoking and oral clefts: the role of detoxification pathway genes. *Epidemiology*. 2008; 19(4): 606-615.
- Loffredo LCM, Freitas JAS, Grigolli AAG. Prevalence of oral clefts from 1975 to 1994, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2001a; 35(6): 571-575.

- Loffredo LC, Souza JM, Freitas JA, Mossey PA. Oral clefts and vitamin supplementation. *Cleft Palate Craniofac J.* 2001b; 38(1):76-83.
- Lorente C, Cordier S, Goujard J, Aymé S, Bianchi F, Calzolari E *et al.* Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Am J Public Health.* 2000; 90(3): 415-419.
- Lu DW, Shi B, Chen HQ, Li Y, Meng T, He X, Zheng Q. The parental craniofacial morphological features in Chinese patients with sporadic nonsyndromic cleft lip with or without palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2009; 46(5):468-476.
- MacKenzie A, Ferguson MW, Sharpe PT. Hox-7 expression during murine craniofacial development. *Development.* 1991; 113(2):601-611.
- Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynski DF *et al.* Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: Including candidates genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet.* 1997; 73: 337-344.
- Mangold E, Reutter H, Birnbaum S, Walier M, Mattheisen M, Henschke H *et al.* Genome-wide linkage scan of nonsyndromic orofacial clefting in 91 families of central European origin. *Am J Med Genet A.* 2009; 149A (12): 2680-2694.
- Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S *et al.* Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet.* 2010; 42(1): 24-26.
- Marazita ML, Field LL, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn S, Liu YE. Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(2):349-364.

- Marazita ML, Neiswanger K. Association studies. In: Wyszynski DFE, ed. Cleft lip and palate: from origin to treatment. Oxford University Press: New York, NY. 2002; 240–254.
- Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, Arcos-Burgos M, Cooper ME, Goldstein T *et al.* Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet.* 2004; 75: 161-173.
- Marazita ML. Subclinical features in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (CL/P): review of the evidence that subepithelial orbicularis oris muscle defects are part of an expanded phenotype for CL/P. *Orthod Craniofac Res.* 2007; 10: 82-87.
- Marazita ML, Lidral AC, Murray J, Field L, Maher BS, McHenry TG *et al.* Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype specific differences in linkage and association results. *Hum Hered.* 2009; 68(3): 151-170.
- Marigo V, Nigro A, Pecci A, Montanaro D, Di Stazio M, Balduini CL, Savoia A. Correlation between the clinical phenotype of MYH9-related disease and tissue distribution of class II nonmuscle myosin heavy chains. *Genomics* 2004; 83:1125–1133.
- Martelli DR, Bonan PRF, Soares MC, Paranaíba LM, Martelli-Júnior H. Analysis of familial incidence of non-syndromic cleft lip and palate in a Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; 15(6): 898-901.
- Martelli-Júnior H, Orsi Júnior J, Chaves MR, Barros LM, Bonan PRF, Freitas JA. Estudo epidemiológico das fissuras labiais e palatais em Alfenas - Minas Gerais - de 1986 a 1998. *RPG.* 2006; 13(1): 31-35.
- Martelli-Junior H, Porto LV, Martelli DR, Bonan PR, Freitas AB, Della Coletta R. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. *Braz Oral Res.* 2007; 21(4): 314-317.

- Martinelli M, Di Stazio M, Scapoli L, Marchesini J, Di Bari F, Pezzetti F, *et al.* Cleft lip with or without cleft palate: implication of the heavy chain of nonmuscle myosin IIA. *J Med Genet.* 2007; 44(6): 387-392.
- Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Ann Rev Cell Biol.* 1990; 6: 597-641.
- Materna-Kirylyuk A, Wisniewska K, Badura-Stronka M, Mejnartowicz J, Wieckowska B, Balcar-Boron A *et al.* Parental age as a risk factor for isolated congenital malformations in a Polish population. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2009; 23(1): 29-40.
- Martinez-Alvarez C, Tudela C, Perez- Miguelsanz J, O’Kane S, Puerta J, Ferguson MWJ. Medial edge epithelial cells fate during palatal fusion. *Dev Biol.* 2000; 220:343–357.
- Menezes R, Letra A, Ruff J, Granjeiro JM, Vieira AR. Studies of genes in the FGF signaling pathway and oral clefts with or without dental anomalies. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A (12): 1614-1617.
- Menezes R, Marazita ML, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Bardi K, Brandon C *et al.* AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. *J Am Dent Assoc.* 2009; 140(1): 80-84.
- Meng L, Bian Z, Torensma R, Von den Hoff JW. Biological Mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J Dent Res.* 2009; 88(1): 22-23.
- Mills JL, Molloy AM, Parle-McDermott A, Troendle JF, Brody LC, Conley MR *et al.* Folate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008; 82(9): 636-643.
- Mitchell LE, Murray JC, O’Brien S, Christensen K. Evaluation of two putative susceptibility loci for oral clefts in the Danish population. *Am J Epidemiol.* 2001; 153:1007–1015.
- Morkūnienė A, Steponaviciūtė D, Utkus A, Kucinskas V. Few associations of candidate genes with nonsyndromic orofacial clefts in the population of Lithuania. *J Appl Genet.* 2007; 48:89–91.



- Mossey PA, Little J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: Wyszynski DF, ed. Cleft lip and palate: from origins to treatment. New York: Oxford University Press. 2002: 127-158.
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet*. 2009; 374(9703): 1773-1785.
- Mukhopadhyay P, Greene RM, Zacharias W, Weinrich MC, Singh S, Young WW, Jr W *et al*. Developmental gene expression profiling of mammalian, fetal orofacial tissue. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2004; 70: 912–926.
- Murray JC, Schutte BC. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest*. 2004 Jun; 113(12):1676-1678.
- Murthy J, Bhaskar LVKS. Current concepts in genetics of nonsyndromic clefts. *Indian J Plast Surg*. 2009; 42 (1): 68-81.
- Nogai H, Rosowski M, Grün J, Rietz A, Debus N, Schmidt G *et al*. Follistatin antagonizes transforming growth factor-beta3-induced epithelial mesenchymal transition in vitro: implications for murine palatal development supported by microarray analysis. *Differentiation*. 2008; 76(4):404–416.
- Nagem Filho H, Moraes N, Rocha RGF. Contribuição para o estudo da prevalência das más formações congênitas labiopalatais na população escolar de Bauru. *Rev Fac Odont USP*. 1968; 6(2): 111-28.
- Nakajima A, Ito Y, Asano M, Maeno M, Iwata K, Mitsui N *et al*. Functional role of transforming growth factor- Type III receptor during palatal fusion. *Developmental Dynamics*. 2007; 236:791–801.
- Nakatomi M, Wang XP, Key D, Lund JJ, Turbe-Doan A, Kist R *et al*. Genetic interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. *Developmental Biology*. 2010; 340: 438-449.
- Narod SA, Hawkins MM, Robertson CM, Stiller CA. Congenital anomalies and childhood cancer in Great Britain. *Am J Hum Genet*. 1997; 60: 474-485.

- Natsume N, Kawai T, Ogi N, Yoshida W. Maternal risk factors in cleft lip and palate: case control study. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 38(1): 23-25.
- Neiswanger K, Deleyiannis FW, Avila JR, Cooper ME, Brandon CA, Vieira AR *et al.* Candidate genes for oral-facial clefts in Guatemalan families. *Ann Plast Surg.* 2006; 56(5): 518-521.
- Neiswanger K, Weinberg SM, Rogers CR, Brandon CA, Cooper ME, Bardi KM *et al.* Orbicularis oris muscle defects as an expanded phenotypic feature in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Am J Med Genet A.* 2007; 143: 1143-1149.
- Nishi M, Miyake H, Takeda T, Hatae Y. Congenital malformations and childhood cancer. *P. Medediatr Oncol.* 2000; 34: 250–254.
- Nopoulos P, Langbehn DR, Canady J, Magnotta V, Richman L Abnormal brain structure in children with isolated clefts of the lip or palate. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007; 161: 753-758.
- Nunes LMN, Queluz DP, Pereira AC. Prevalência de fissuras labiopalatais no município de Campos dos Goytacazes-RJ, 1999-2004/ Prevalence of oral cleft in Campos dos Goytacazes-RJ, 1999-2004. *Rev Bras Epidemiol.* 2007; 10(1): 109-116.
- Palmieri A, Masiero E, Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Caramelli E *et al.* The MTHFD1 gene is not involved in cleft lip with or without palate onset among the Italian population. *Ann Hum Genet.* 2008; 72(3): 297-299.
- Paranaíba LM, Martelli-Junior H, Oliveira Swerts MS, Line SR, Coletta RD. Novel mutations in the IRF6 gene in Brazilian families with Van der Woude syndrome. *Int J Mol Med.* 2008; 22(4): 507-511.
- Paranaíba LM, de Almeida H, de Barros LM, Martelli DRB, Orsi Júnior JD, Martelli Júnior H. Reabilitação cirúrgica de fissuras lábio-palatinas, no estado de Minas Gerais, Brasil. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009; 75(6): 839-843.
- Paranaíba LM, Bufalino A, Martelli-Junior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD. Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371

- and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis.* 2010; 16(2): 193-197.
- Park JW, McIntosh I, Hetmanski JB, Jabs EW, Vander Kolk CA, Wu-Chou YH *et al.* Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. *Genet Med.* 2007; 9: 219–227.
  - Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. 2003. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 177-182.
  - Puho EH, Szunyogh M, Metneki J, Czeizel AE. Drug treatment during pregnancy and isolated orofacial clefts in Hungary. *Cleft Palate Craniofac J.* 2007; 44(2): 194-202.
  - Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcolm S. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet.* 2000; 106(3):345-350.
  - Prescott NJ, Malcolm S. Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *Cleft Palate Craniofac J.* 2002; 39(3): 327-331.
  - Proetzel G, Pawlowski AS, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J. Transforming growth factor-B3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet.* 1995; 11: 409-414.
  - Rajabian MH, Sherkat M. An epidemiologic study of oral clefts in Iran: analysis of 1,669 cases. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37(2): 191-196.
  - Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M *et al.* Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet.* 2008; 40(11): 1341-1347.
  - Reutter H, Birnbaum S, Mende M, Lauster C, Schmidt G, Henschke H. TGF $\beta$ 3 displays parent-of-origin effects among central Europeans with nonsyndromic cleft lip and palate. *J Hum Genet.* 2008; 53:656–661.

- Richardson RJ, Dixon J, Jiang R, Dixon MJ. Integration of IRF6 and Jagged2 signalling is essential for controlling palatal adhesion and fusion competence. *Human Molecular Genetics*. 2009; 18(14): 2632–2642.
- Riley BM, Murray JC. Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in nonsyndromic cleft lip and palate cases. *Am J Med Genet*. 1997; 143: 3228–3234.
- Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM *et al*. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007a; 104(11): 4512-4517.
- Riley BM, Schultz RE, Cooper ME, Goldstein-McHenry T, Daack-Hirsch S, Lee KT *et al*. A genome-wide linkage scan for cleft lip and cleft palate identifies a novel locus on 8p11-23. *Am J Med Genet Part A*. 2007b; 143A: 846-852.
- Rittler M, Liascovich R, Lopez-Camelo J, Catilla EE. Parental consanguinity in specific types of congenital anomalies. *Am J Med Genet*. 2001; 102: 36-43.
- Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res*. 2009; 23(1): 38-42.
- Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*. 2009; 169(4):505-514.
- Rodriguez-Pinilla E, Martinez-Frias ML. Corticosteroids during pregnancy and oral clefts: a case-control study. *Teratology*. 1998; 58(1): 2-5.
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology*. 1999; 59(1): 39-50.

- Romitti PA, Sun L, Honein MA, Reefhuis J, Correa A, Rasmussen SA. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk of orofacial clefts. *Am J Epidemiol.* 2007; 166(7): 775-785.
- Sak RJ, Ruben RJ. Effects of recurrent middle ear effusion in preschool years on language and learning. *J Dev Behav Pediatr.* 1982; 3(1): 7-11.
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP *et al.* TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development.* 1997; 124(13): 2659-2670.
- Sato F, Natsume N, Machido J, Suzuki S, Kawai T. Association between transforming growth factor beta 3 and cleft lip and/or palate in the Japanese population. *Plast Reconstr Surg.* 2001; 107:1909–1910.
- Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet.* 1994; 6(4): 348-356.
- Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Bodo M, Tognon M, Carinci P. Linkage disequilibrium between GABRB3 gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate. *Hum Genet.* 2002; 110:15–20
- Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Carinci F, Marchesini J, Martinelli M *et al.* Investigation of the W185X nonsense mutation of *PVRL1* gene in Italian nonsyndromic cleft lip and palate patients. *Am J Med Genet A.* 2004; 127A (2): 211.
- Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M *et al.* Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am J Hum Genet.* 2005; 76(1): 180-183.
- Scapoli L, Martinelli M, Arlotti M, Palmieri A, Masiero E, Pezzetti F *et al.* Genes causing clefting syndromes as candidates for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: a family-based association study. *Eur J Oral Sci.* 2008; 116(6): 507-511.

- Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1496:3–22.
- Seri M, Pecci A, Di Bari F, Cusano R, Savino M, Panza E. MYH9-related disease: May- Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)*. 2003; 82:203–215.
- Shaw GM, Croen LA, Curry CJ. Isolated oral cleft malformations: associations with maternal and infant characteristics in a California population. *Teratology*. 1991; 43(3): 225-228.
- Shaw GM, Nelson V, Iovannisci DM, Finnell RH, Lammer EJ. Maternal occupational chemical exposures and biotransformation genotypes as risk factors for selected congenital anomalies. *Am J Epidemiol*. 2003; 157: 475–484.
- Shi M, Christensen K, Weinberg CR, Romitti P, Bathum L, Lozada A *et al*. Orofacial Cleft Risk Is Increased with Maternal Smoking and Specific Detoxification-Gene Variants. *Am J Hum Genet*. 2007; 80:76–90.
- Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K *et al*. Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2009; 85(1): 42-51.
- Schultz RE, Cooper ME, Daack-Hirsch S, Shi M, Nepomucena B, Graf KA *et al*. Targeted scan of fifteen regions for nonsyndromic cleft lip and palate in Filipino families. *Am J Med Genet A*. 2004; 125A (1): 17-22.
- Silva CHV, Araújo ACS, Fernandes RSM, Alves KA, Pelinca RN, Dias YC. Profile of primary dental care of the Federal University of Pernambuco. *Odont Clín-Científ*. 2009; 8 (3); 229-235.
- Sivertsen A, Wilcox AJ, Skjaerven R, Vindenes HA, Abyholm F, Harville E *et al*. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ*. 2008; 336: 432-434.

- Slayton RL, Williams L, Murray JC, Wheeler JJ, Lidral AC, Nishimura CJ. Genetic sociation studies of cleft lip and/or palate with hypodontia outside the cleft region. *Cleft Palate Craniofac J.* 2003; 40: 274-279.
- Sperber GH. Formation of the primary and secondary palate. In: Wyszynski DF, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment.* New York: Oxford University Press, 2002: 5–24.
- Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo.* 1972; 27(1): 5-6.
- Spilson SV, Kim HJ, Chung KC. Association between maternal diabetes mellitus and newborn oral cleft. *Ann Plast Surg.* 2001; 47: 477–481.
- Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(1): 73-81.
- Steinwachs EF, Amos C, Johnston D, Mulliken J, Stal S, Hecht JT. Nonsyndromic cleft lip and palate is not associated with cancer or other birth defects. *J Am G Medenet.* 2000; 90: 17–24.
- Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Epidemiologic and genetic study in 207 cases of oral clefts in Alsace, North- Eastern France. *J Med Genet.* 1991; 28: 325-329.
- Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Parent-of-origin effects for *MSX1* in a Chilean population with nonsyndromic cleft lip/palate. *Am J Med Genet Part A.* 2010; 152A (8):2011-2016.
- Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper M *et al.* In a Vietnamese population *MSX1* variants contribute to cleft lip and palate. *Genet Med.* 2004; 6: 117-125.
- Taioli E, Ragin C, Robertson L, Linkov F, Thurman NE, Vieira AR. Cleft Lip and Palate in Family Members of Cancer Survivors. *Cancer Invest.* 2010; 28(9):958-962.

- Tanabe A, Taketani S, Endo-Ichikawa Y, Tokunaga R, Ogawa Y, Hiramoto M. Analysis of the candidate genes responsible for non-syndromic cleft lip and palate in Japanese people. *Clin Sci (Lond)*. 2000 ; 99:105–111.
- Tang W, Du X, Feng F, Long J, Lin Y, Li P *et al*. Association analysis between the IRF6 G820A polymorphism and nonsyndromic cleft lip and/or cleft palate in a Chinese population. *Cleft Palate Craniofac J*. 2009; 46(1): 89-92.
- Thesleff I, Vaahtojkari A, Partanem A. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol*. 1995; 39: 35–50.
- Thomas AM, Chopra S, Singh N, Simratvir M, Moghe G. Syndromes associated with labiopalatine clefting: a report of three cases. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2008; 26(2): 88-91.
- van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet*. 2000; 24(4): 342-3.
- Van Bokhoven H, Hamel BC, Bamshad M, Sangiorgi E, Gurrieri F, Duijf PH *et al*. p63 Gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*. 2001; 69: 481-492.
- van Rooij IA, Ocke MC, Straatman H, Zielhuis GA, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Prev Med*. 2004; 39(4): 689-694.
- Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nature Genet*. 1996; 13: 417–421.
- Vieira AR, Karras JC, Orioli IM, Castilla EE, Murray JC. Genetic origins in a South American clefting population. *Clin Genet*. 2002; 62(6): 458-463.



- Vieira AR, Romitti PA, Orioli IM, Castilla EE. Complex segregation analysis of 1,792 cleft lip and palate families in South America: 1967-1997. *Pesqui Odontol Bras.* 2003; 17(2): 161-165.
- Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC. MSX1 and TGF $\beta$ 3 Contribute to Clefting in South America. *J Dent Res.* 2003b; 82(4):289-292.
- Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix TM, Rahimov F *et al.* Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.* 2005; 1(6): 651-659.
- Vieira AR. Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2006;163(9):790-810.
- Vieira AR, Modesto A, Meira R, Barbosa AR, Lidral AC, Murray JC. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) contribute to human tooth agenesis. *Am J Med Genet A.* 2007; 143(6): 538-545.
- Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Castilla EE, Orioli IM. Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only. *Braz J Med Biol Res.* 2008a; 41(8): 689-93.
- Vieira AR, McHenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. A genome wide linkage scan for cleft lip and palate and dental anomalies. *Am J Med Genet A.* 2008b; 146A (11): 1406-1413.
- Vieira AR, Marazita ML, Goldstein-McHenry T. Genome-wide scan finds suggestive caries loci. *J Dent Res.* 2008c; 87(5): 435-439.
- Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res.* 2008; 87(2): 119-125.
- Xu J, Krabs LT, Gridley T. Generation of mice with a conditional null Allele of the Jagged2 gene. *Genesis.* 2010; 48:390-393.

- Warrington A, Vieira AR, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Romitti PA *et al.* Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. *J Med Genet.* 2006; 43(6): 26.
- Weinberg SM, Neiswanger K, Martin R, Mooney MP, Kane AA, Wenger SL. The Pittsburgh Oral-Facial Cleft study: expanding the cleft phenotype. Background and justification. *Cleft Palate Craniofac J.* 2006; 43: 7–20.
- WHO Human Genetics Programme. Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies: report of WHO meetings on international collaborative research on craniofacial anomalies. Geneva: World Health Organization, 2002.
- Wyszynski DF, Albacha-Hejazi H, Aldirani M, Hammod M, Shkair H, Karam A *et al.* A genome-wide scan for loci predisposing to non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in two large Syrian families. *Am J Med Genet A.* 2003; 123A (2): 140-147.
- Yoon H, Chung IS, Seol EY, Park BY, Park HW. Development of the lip and palate in staged human embryos and early fetuses. *Yonsei Med J.* 200; 41:477–484.
- Zarante I, Lopez MA, Caro A, Garcia-Reyes JC, Ospina JC. Impact and risk factors of craniofacial malformations in a Colombian population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009; 73 (10): 1434-1437.
- Zeiger JS, Beaty TH. Is there a relationship between risk factors for oral clefts? *Teratology.* 2002; 66(5): 205-208.
- 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. *Br J Cancer.* 2002; 87: 524-528.
- Zhu J, Hao L, Li S, Bailey LB, Tian Y, Li Z. MTHFR, TGF $\beta$ 3, and TGF $\alpha$  polymorphisms and their association with the risk of non-syndromic cleft lip and cleft palate in China. *Am J Med Genet A.* 2010; 152A (2):291-298.

## 9. ANEXO 1

---

---



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Avaliação de polimorfismos gênicos em pacientes com fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas**", protocolo nº 152/2009, dos pesquisadores Ricardo Della Coletta, Lívia Máris Ribeiro Paranaíba e Sibeles Nascimento de Aquino, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 28/06/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Polymorphisms in patients with nonsyndromic cleft lip and palate**", register number 152/2009, of Ricardo Della Coletta, Lívia Máris Ribeiro Paranaíba and Sibeles Nascimento de Aquino, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 06/28/2010.

**Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas**  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.