

ELIZABETE BAGORDAKIS PINTO

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE
SUSCETIBILIDADE ÀS FISSURAS LÁBIO-PALATINAS NÃO-
SINDRÔMICAS EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

PIRACICABA
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ELIZABETE BAGORDAKIS PINTO

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE
SUSCETIBILIDADE ÀS FISSURAS LÁBIO-PALATINAS NÃO-
SINDRÔMICAS EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À FACULDADE
DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ESTOMATOPATOLOGIA
NA ÁREA DE PATOLOGIA.

Este exemplar corresponde à versão final
da Dissertação defendida pelo aluno,
e orientada pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

P658i Pinto, Elizabete Bagordakis, 1987-
Identificação de polimorfismos genéticos de suscetibilidade às
fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas em uma população
brasileira / Elizabete Bagordakis Pinto. -- Piracicaba, SP : [s.n.],
2012.

Orientador: Ricardo Della Coletta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fissura palatina. 2. Fatores de risco. I. Della Coletta,
Ricardo, 1972- II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Characterization of susceptibility polymorphic markers for
non-syndromic cleft lip and/or palate in the brazilian population

Palavras-chave em Inglês:

Cleft palate

Risk factors

Área de concentração: Patologia

Titulação: Mestra em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Ricardo Della Coletta [Orientador]

Fabio Augusto Ito

Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Data da defesa: 23-07-2012

Programa de Pós-Graduação: 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 23 de Julho de 2012, considerou a candidata ELIZABETE BAGORDAKIS PINTO aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ricardo Della Coletta", written over a horizontal line.

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Fabio Augusto Ito", written over a horizontal line.

Prof. Dr. FABIO AUGUSTO ITO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga", written over a horizontal line.

Profa. Dra. RAQUEL MANTUANELI SCAREL CAMINAGA

DEDICATÓRIA

A **Deus** que me ajuda e está presente em todos os momentos da minha vida, guiando e dando sabedoria.

Aos meus pais **Elizabete** e **Osny**, meus grandes tesouros, são bênçãos que Deus colocou em minha vida, agradeço pela força e pelo apoio sempre presente em minhas escolhas.

Ao **Professor Dr. Fabio Augusto Ito**, registro minha gratidão pela oportunidade de realizar meus primeiros trabalhos durante a graduação, pelos aconselhamentos, incentivo e amizade.

*Ao meu orientador, **Professor Dr. Ricardo Della Coletta**, exemplo de dedicação e amor pela profissão, agradeço pela oportunidade, confiança, orientação e ensinamentos transmitidos. Grande parte deste trabalho deve-se ao seu incentivo e apoio por todo o desenrolar deste estudo.*

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi realizada com a participação e apoio de muitas pessoas e instituições dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

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

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

aos Professores Drs. **Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Augustin Vargas, Ricardo Della Coletta, Oslei Paes de Almeida**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Expresso a minha admiração pela competência e seriedade com que realizam suas funções de ensino e pesquisa nesta instituição;

à **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado;

à **Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS)**, Alfenas, Minas Gerais, na pessoa do **Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts**, quem viabilizou este trabalho conjunto com a UNICAMP;

à participação do **Centro Pró-Sorriso de Alfenas (Centrinho)**, sem o qual este trabalho não seria possível;

a todos os **pacientes, familiares** e aos **voluntários** que se dispuseram, com tanto desprendimento e generosidade, a participar desta pesquisa;

aos meus queridos amigos e companheiros de Laboratório: **Andréia Silva, Ana Camila, Camilla, Fernanda, Isadora, Débora, Luciana, Manoela, Marco Antônio, Priscila, Rose e Sibeles**, pelo apoio, amizade e por estarem sempre dispostos a dividir o que sabem;

especificamente, à pós-graduanda, **Andréia Bufalino** e à **Dr^a Livia Máris Ribeiro Paranaíba**, pela grande colaboração, disponibilidade e pelos ensinamentos de laboratório transferidos no início de meu mestrado e parceria neste estudo;

aos pós-graduandos do curso de Estomatopatologia **Alicia, Bruno, Daniel, Felipe, Harim, Juscelino, Karina, Lara, Lucas, Marianne, Marisol, Marcondes, Nathalia, Rodrigo, Rogério, Sabino, Sabrina, Victor e Wilfredo**, pela convivência maravilhosa em Piracicaba;

a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu profundo agradecimento.

“Ao homem pertencem os planos do coração, mas do Senhor vem a resposta da língua. Todos os caminhos do homem lhe parecem puros, mas o Senhor avalia o espírito. Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos. O Senhor faz tudo com um propósito; até os ímpios para o dia do castigo. O Senhor detesta os orgulhosos de coração. Sem dúvida serão punidos. Com amor e fidelidade se faz expiação pelo pecado; com o temor do Senhor o homem evita o mal. Quando os caminhos de um homem são agradáveis ao Senhor, ele faz que até os seus inimigos vivam em paz com ele.”

Provérbios 16:1-7

RESUMO

Fissuras do lábio e/ou palato (FL/P) representam as anomalias congênitas mais comuns da face, correspondendo a aproximadamente 65% de todas as malformações da região craniofacial. Em 70% dos casos, as FL/Ps se apresentam como fenótipos isolados, recebendo a denominação FL/P não-sindrômica (FL/PNS). Embora estudos recentes de larga escala genômica descreveram várias regiões cromossômicas e genes candidatos à etiologia das FL/PNS, apenas poucos foram confirmados em diferentes populações. Um dos possíveis fatores que podem induzir uma discrepância nos resultados é a diferença na composição (mistura) étnica das populações. Então, como o Brasil é composto por uma população altamente miscigenada é importante confirmar se tais marcadores também mostram suscetibilidade à FL/PNS na população brasileira. O propósito deste estudo caso-controle foi avaliar o envolvimento de polimorfismos genéticos que foram recentemente descritos como marcadores de risco para o desenvolvimento de FL/PNS em um grupo brasileiro de pacientes com FL/PNS. A influência da ancestralidade populacional na suscetibilidade a FL/PNS destes marcadores genéticos também foi avaliada. Os polimorfismos rs560426 em 1p22.1, rs2013162 em 1q32, rs987525 e rs1530300 em 8q24, rs1443434 e rs3758249 em 9q21, rs7078160 em 10q25.3, rs17085106 em 18q22 e rs13041247 em 20q12 foram genotipados em 338 indivíduos saudáveis (grupo controle) e 345 pacientes com FL/PNS pelo método de discriminação alélica com sondas fluorescentes. A ancestralidade genômica de cada indivíduo foi determinada pela caracterização de 40 marcadores bialélicos de inserção/deleção (INDELs). A distribuição genotípica de todos os polimorfismos no grupo controle respeitou o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência do alelo G no polimorfismo rs560426 foi significativamente maior no grupo FL/PNS comparado ao grupo controle, gerando um *odds ratio* (OR) de 1,44 (IC 95%: 1,16-1,78; p=0,0008). A distribuição dos polimorfismos da região 8q24 (rs987525 e rs1530300) também foi significativamente correlacionada com a suscetibilidade ao desenvolvimento de FL/PNS como marcadores individuais ou em haplótipo. Os 3 polimorfismos

(rs560426, rs987525 e rs1530300) revelaram associação com a fissura labial isolada (FL) e a fissura lábio-palatina (FLP), mas não com o risco de desenvolver fissura palatina isolada (FP). Após o ajuste para a ancestralidade genômica, as correlações dos polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 com FL/PNS foram mantidas. Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram a associação dos polimorfismos localizados em 1p22.1 (rs560426) e em 8q24 (rs987525 e rs1530300) com a suscetibilidade genética ao desenvolvimento de FL/PNS na população brasileira.

Palavras-chave: Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica; Fator de risco; Ancestralidade; Polimorfismo; 1p22.1; 8q24.

ABSTRACT

Cleft lip and/or palate (CL/P) is the most common congenital anomaly of the face, corresponding to approximately 65% of all malformations in the craniofacial region. In 70% of the cases, CL/Ps are found as an isolated phenotype, receiving the denomination nonsyndromic CL/P (NSCL/P). Although recent genome-wide association studies have been identified a varied of chromosomal loci and candidate genes in association with NSCL/P development, just few of them has been replicated in different populations. These contradictory results may be related to the differences in the ethnicity of the populations. Thus, as the Brazilian population is one of the most heterogeneous in the world, it is important to confirm the susceptibility of those markers identified in genetically homogenous populations in the Brazilian population. The purpose of this case-control study was to verify the association of single nucleotide polymorphisms, which were identified as NSCL/P risk markers, with NSCL/P in a Brazilian population. The influence of the genetic ancestry of the population on susceptibility of those markers was also investigated. The polymorphisms rs560426 in 1p22.1, rs2013162 in 1q32, rs987525 and rs1530300 in 8q24, rs1443434 and rs3758249 in 9q21, rs7078160 in 10q25.3, rs17085106 in 18q22, and rs13041247 in 20q12 were genotyped in 338 samples from healthy individuals (control group) and 345 NSCL/P patients by the allelic discrimination method with fluorescence probes. The genomic ancestry of each individual was determined by genotyping 40 biallelic short insertion-deletion polymorphic markers (INDELs). The genotype frequencies observed for all studied polymorphisms in the control group did not reveal statistically significant differences compared to those expected under Hardy-Weinberg equilibrium. The percentage of the G allele of rs560426 polymorphism was found to be significantly higher in the NSCL/P group as compared to the control group, revealing an odds ratio (OR) of 1.44 (95% CI 1.16-1.78; $p=0.0008$). The distributions of both 8q24 polymorphisms (rs987525 and rs1530300) were significantly correlated with NSCL/P susceptibility as individual or haplotype markers. All 3 markers were associated with the

development of isolated (CL) and cleft lip and palate (CLP), but not with cleft palate only (CP). After adjustment to ancestry contribution, correlations of all 3 polymorphisms were kept. In conclusion, the findings of the present study demonstrate the association of polymorphisms located at 1p22.1 and 8q24 with NSCL/P in the Brazilian population.

Key words: Nonsyndromic cleft lip and/or palate; Risk factor, Ancestry; Polymorphism; 1p22.1; 8q24.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA4: ATP-Binding Cassette, subfamily A, member 4 (membro da superfamília ATP-ligante à fita transportadora, subfamília A, membro 4)

ADH1C: Alcohol dehydrogenase 1c (gene da enzima álcool desidrogenase)

BMP4: Bone morphogenetic protein 4 (gene da proteína 4 morfogenética óssea tipo 4)

DNA: Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)

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

FL/P: Fissura labial e/ou palatina

FL/PNS: Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica

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

GWAS: Genome Wide Association Study (estudo de associação de larga escala genômica)

IC: Intervalo de confiança

Indel: polimorfismo de inserção e deleção de pequenos fragmentos de DNA

IRF6: Interferon regulatory factor 6 (membro 6 da família reguladora de interferon)

OD: *Odds ratio* (razão das chances)

MAFB: V-MAF Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Family, protein B (gene relacionado à regulação da hematopoiese linhagem-específica em células mielóides)

MSX: Muscle Segment Homeobox (gene homeótipo do segmento muscular)

MTHFD1: Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 (Metilenotetraidrofolato desidrogenase 1)

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

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

MYF-5: Myogenic Factor-5 (fator miogênico-5)

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

PARG1: Rho GTPase-Activating Protein (gene da proteína ativadora de GTPase em Rho)

PPS: *Popliteal pterygium syndrome* (Síndrome pterígio-poplíteo)

PTPL1: *Protein-Tyrosine Phosphatase* (gene da tirosina fosfatase)

Real Time PCR: Real Time - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)

rs: reference sequence

SLC19A1: Solute carrier family 19, member 1- (membro 1 da família 19 de carreadores de soluto)

VAX1: *Ventral Anterior Homeobox 1* (gene relacionado ao desenvolvimento do olho e do prosencéfalo)

VWS: *van der Woude syndrome* (Síndrome de van der Woude)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Fissura Labial e/ou Palatina Não-Sindrômica (FL/PNS)	3
2.2. Dados Epidemiológicos	5
2.3. Embriologia	6
2.4. Etiologia	7
2.4.1. Fatores Ambientais e Possível Interação com Polimorfismos Genéticos	10
2.4.2. Fatores Genéticos	15
2.5. Ancestralidade e a sua Influência em Estudos com Polimorfismos Genéticos	23
3. PROPOSIÇÃO	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	28
4.2. População	28
4.3. Seleção dos Polimorfismos Gênicos	28
4.4. Coleta das amostras para Análise dos Polimorfismos	29
4.5. Isolamento do DNA	29
4.6. Genotipagem pelo Método de Discriminação Alélica com Sondas Fluorescentes	30
4.7. Genotipagem dos Marcadores de Ancestralidade	30
4.8. Análise Estatística	31
5. RESULTADOS	33
5.1. Características Gerais dos Grupos	33

5.2. Frequência Alélica e Genotípica dos Polimorfismos	33
5.3. Análise dos Haplótipos dos Polimorfismos rs987525 e rs1530300	38
5.4. Distribuição dos Polimorfismos Genéticos em Relação ao Tipo de Fissura	38
5.5. Análise Estruturada pela Ancestralidade dos Polimorfismos Genéticos	43
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	
ANEXO I: Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos	76

1. INTRODUÇÃO

As fissuras orofaciais estão entre as alterações congênitas mais prevalentes nos seres humanos (Gorlin *et al.*, 2001; Stanier & Moore, 2004; Jugessur *et al.*, 2009) e apresentam um importante impacto social como fonte de substancial morbidade e mortalidade mundial (Murray, 2002). Em 70% dos casos, as fissuras labiais e/ou palatinas (FL/P) se apresentam como não-sindrômicas (FL/PNS), ou seja, sem malformações estruturais nos demais órgãos e sem alterações comportamentais e/ou cognitivas (Schutte & Murray, 1999; Gorlin *et al.*, 2001). Os demais 30% são resultados de desordens mendelianas (autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao X), cromossômicas, teratogênicas e associações esporádicas com outros defeitos congênitos (Schutte & Murray, 1999; Thomas *et al.*, 2008). A incidência das FL/PNS é de aproximadamente 1 em cada 500-2.000 nativos, variando de acordo com a localização geográfica, etnia e condição socioeconômica da população estudada (Dixon *et al.*, 2011). No Brasil, os estudos quanto à incidência das FL/PNS são escassos e variam consideravelmente. De acordo com os levantamentos brasileiros, a incidência das FL/PNS varia de 0,19 a 1,54 para cada 1.000 nascidos vivos (Loffredo *et al.*, 2001a; Martelli-Júnior *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009).

Mesmo representando uma alteração do desenvolvimento comum, a etiopatogenia das FL/PNS permanece obscura. Tal desconhecimento é provavelmente reflexo da vasta diversidade de mecanismos moleculares relacionados à embriogênese facial com a participação de múltiplos genes e da influência de fatores ambientais (Carinci *et al.*, 2007; Vieira, 2008). Dentre os principais fatores ambientais de risco para o desenvolvimento das FL/PNS estão o uso de medicamentos, o consumo de bebidas alcoólicas, o tabagismo, a dieta materna e a suplementação vitamínica particularmente durante o primeiro trimestre de gestação (Johnson & Little, 2008; Vieira, 2008; Zarante *et al.*, 2009; Leite & Koifman, 2009; Jia *et al.*, 2009; Bufalino *et al.*, 2010). Os esforços para a descoberta de marcadores genéticos de suscetibilidade ao desenvolvimento das FL/PNS são intensos e se utilizam de inúmeras

estratégias, incluindo estudos de associação ou ligação em genes candidato e de varredura genômica em condições como caso-controle, trios (pai, mãe e indivíduo afetado), agregação familiar e concordância em gêmeos (Mangold *et al.*, 2009; Blanton *et al.*, 2010; Grosen *et al.*, 2011; Jakobsen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Contudo, muitos dos genes e *loci* encontrados nestes estudos não foram replicados em diferentes populações. Os marcadores no gene *IRF6* (Marazita *et al.*, 2009; Rahimov *et al.*, 2008; Blanton *et al.*, 2005; Scapoli *et al.*, 2005; Jugessur *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2007) e no deserto genômico 8q24 são os mais consistentes, visto que foram confirmados em diferentes populações (Murray *et al.*, 2012; Rojas-Martinez *et al.*, 2010; Mostowska *et al.*, 2010; Birnbaum *et al.*, 2009). Entre os diferentes fatores que podem contribuir para uma discordância com os resultados dos estudos de larga escala genômica estão provavelmente a heterogeneidade de fatores genéticos responsáveis por esta condição, a influência de fatores ambientais na modulação dos genes relacionados à alteração e às diferenças étnicas de cada população. A estrutura populacional, resultado da composição (mistura) étnica, é outro fator que pode influenciar e dificultar a busca por marcadores genéticos das FL/PNS, principalmente em países com histórico recente de miscigenação. No Brasil, este fator pode ter uma influência muito importante, visto que nossa colonização é recente (em termos genéticos) e foi caracterizada por diferentes grupos de imigrantes que se misturaram em demasia (Parra *et al.*, 2003).

O objetivo deste estudo caso-controle foi investigar marcadores genéticos que foram recentemente descritos como de susceptibilidade para FL/PNS em estudos de larga escala genômica, incluindo os polimorfismos rs560426 em 1p22.1, rs2013162 em 1q32, rs987525 e rs1530300 em 8q24, rs1443434 e rs3758249 em 9q21, rs7078160 em 10q25.3, rs17085106 em 18q22 e rs13041247 em 20q12 (Grant *et al.*, 2009; Marazita *et al.*, 2009; Beaty *et al.*, 2010; Mangold *et al.*, 2010). Em adição, nós verificamos a influência da estratificação populacional (ancestralidade de cada indivíduo) na susceptibilidade a FL/PNS destes marcadores genéticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fissura Labial e/ou Palatina Não-Sindrômica (FL/PNS)

As fissuras orofaciais 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). Estas anomalias estão entre as alterações congênitas mais prevalentes nos seres humanos (Gorlin *et al.*, 2001; Stanier & Moore, 2004; Jugessur *et al.*, 2009). As fissuras podem ser classificadas em 3 grupos, tendo como referência anatômica o forame incisivo: (1) fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais (FL), (2) fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP) e (3) fissuras transforame incisivo ou fissuras lábio-palatinas (FLP) (Spina *et al.*, 1972). A FL é resultante da falta de fusão parcial ou total entre o processo nasal medial e os processos maxilares laterais, enquanto a falta de união dos processos palatinos é responsável pela FP (Carinci *et al.*, 2007). As fissuras orofaciais apresentam um padrão não-sindrômico (FL/PNS), isto é, sem malformações estruturais nos demais órgãos e sem alterações comportamentais e/ou cognitivas, em 70% dos indivíduos afetados (Schutte & Murray, 1999; Gorlin *et al.*, 2001). Baseado em evidências embriológicas e epidemiológicas, as FLs e FLPs são consideradas variantes do mesmo defeito e classificadas como um único grupo, designado FL/P, enquanto que as FPs são classificadas como uma entidade distinta (Fraser, 1970; Mitchell *et al.*, 2002). Contudo, estudos recentes de genética molecular não suportam o agrupamento das FLs e FLPs em um único grupo (Jugessur *et al.*, 2011; Marazita, 2002a; Mossey & Little, 2002).

As FL/PNS apresentam um impacto significativo para a saúde pública em termos de despesas médicas e serviços relacionados, bem como um efeito social importante para os pacientes e seus familiares (Berk & Marazita, 2002; Mossey *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos, por exemplo, o custo de um paciente com FL/PNS até a vida adulta foi estimado em 100 mil dólares (Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov>). Crianças afetadas por FL/PNS podem necessitar de cuidados de uma equipe

multiprofissional durante toda a vida em decorrência dos diversos problemas ocasionados pela malformação, com destaque para as dificuldades de alimentação, fonação e audição e alterações dentais, além da interferência social e psicológica que a deformidade em si acarreta. Uma equipe multiprofissional para melhor acompanhamento e tratamento dos pacientes com FL/PNS conta com médicos em suas várias especialidades incluindo pediatras, cirurgiões plásticos, geneticistas e otorrinolaringologistas, cirurgiões dentistas, fonoaudiólogos, psicólogos, nutricionistas e fisioterapeutas (Christensen *et al.*, 2004).

Pacientes com FL/PNS apresentam maior morbidade e mortalidade quando comparados a indivíduos sem fissura (Christensen *et al.*, 2004). Comparada ao restante da população, crianças com fendas orais sem outras alterações adicionais têm um risco duas vezes maior de morrer antes de completar um ano de idade (Carlson *et al.*, 2011). Contribuindo para o aumento da mortalidade, destaca-se a maior ocorrência de desordens psiquiátricas e de neoplasias malignas nesses indivíduos (Christensen & Mortensen, 2002). Anormalidades estruturais, incluindo diminuição do volume cerebral e cerebelar e alterações na trajetória do desenvolvimento do cérebro, foram identificadas em associação às FL/PNS (Nopoulos *et al.*, 2007; Vieira, 2008). Marcucio e colaboradores (2005) demonstraram que defeitos na sinalização celular do prosencéfalo podem levar a grande variedade de malformações craniofaciais, incluindo a FL/PNS. A ocorrência de déficits cognitivos nos casos de FL/PNS é menos acentuada quando comparada às fissuras sindrômicas, porém, podem ser de 6 a 10 vezes mais prevalente em crianças com fissuras quando comparado com a população em geral (Broder *et al.*, 1998). Em adição, Christensen & Mortensen (2002) demonstraram que pacientes fissurados apresentam um risco aumentado de hospitalização por distúrbios psiquiátricos. Então, distúrbios psiquiátricos podem ser interpretados sob a óptica de que a embriogênese do cérebro e da face estão intimamente relacionadas, e uma alteração no desenvolvimento facial pode direcionar um desenvolvimento anormal do cérebro (Nopoulos *et al.*, 2007).

Um protocolo padrão para o atendimento e a reabilitação dos pacientes com FL/PNS 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 prevalência das FL/PNS não é conhecida em todas as regiões do mundo, porém, as informações disponíveis indicam que esta malformação afeta aproximadamente 1 em cada 500 a 2000 nascidos vivos, dependendo da origem geográfica, do grupo étnico, do gênero e do padrão socioeconômico da população estudada (Gorlin *et al.*, 2001; Mossey e Little, 2002; Murthy & Bhaskar, 2009). Entre os diferentes grupos populacionais, observamos uma menor prevalência entre africanos e descendentes de africanos (0,3:1000), seguida pelos europeus (0,7-1,3:1000) e uma alta prevalência entre chineses (1,4:1000), japoneses (2,1:1000) e ameríndios (3,6:1000) (Carinci *et al.*, 2007). O tipo de fissura também apresenta distribuição distinta entre as populações (Mossey e Little, 2002; Mossey *et al.*, 2009). A frequência de FLP é maior em algumas regiões da América Latina e Ásia (China e Japão) e menor em Israel, África do Sul e sul da Europa (Mossey e Little, 2002). Comparações entre os grupos étnicos nos Estados Unidos (Croen *et al.*, 1998) e no Reino Unido (Leck & Lancashire, 1995) 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 similar a do país de origem.

Em geral, dados epidemiológicos provenientes de diversas populações mostram que as incidências das FL e FLP são maiores do que as das FP e que o gênero masculino é mais afetado pelas FL/PNS do que o feminino na ordem de 2:1 (revisado por Mossey & Little, 2002). FP apresenta uma prevalência de 1:1.500-2.000 nascidos vivos e apresenta uma relação de 0,73:1 entre homens e mulheres caucasianas (revisado por Murthy & Bhaskar, 2009). Ainda, considerando a lateralidade, o lado esquerdo é mais acometido do que o direito (2:1) (Lidral *et al.*, 2008; Murthy & Bhaskar, 2009).

No Brasil, a estimativa de nascidos com FL/PNS varia de 0,28 a 1,54 para cada 1.000 nascimentos (Menegotto & Salzano, 1991; Loffredo *et al.*, 2001b). O estudo de Freitas e colaboradores (2004) com pacientes assistidos no Centrinho de Bauru revelou uma maior frequência das FLP (37,1%) e os homens foram os mais afetados, embora tenha existido um predomínio de mulheres entre as FP isoladas. 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-Junior *et al.*, 2006). O segundo estudo observou maior frequência de FLP (39,68%), seguida por FL (38,09%) e FP (22,23%) (Martelli-Junior *et al.*, 2007). Esse estudo também demonstrou que a relação entre homens e mulheres foi de 1,3:1, sendo os homens 2,57 vezes mais atingidos por FLP do que as mulheres. As FL unilaterais foram mais frequentes que as bilaterais (Martelli-Junior *et al.*, 2007). Um estudo conduzido no município de Campos dos Goytacazes-RJ encontrou uma prevalência similar àquela observada no sul do estado de Minas Gerais, demonstrando uma incidência de 1,35 casos de FL/PNS para cada 1.000 nativos (Nunes *et al.*, 2007). Em um estudo recente, Rodrigues *et al.* (2009) relataram 5.764 novos casos de fissuras orofaciais 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.

2.3. Embriologia

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, a fissura orofacial é a

anomalia congênita facial humana de maior frequência (Prescott & Malcolm, 2002). As FL/P podem ser isoladas ou associadas a um universo de mais de 400 diferentes síndromes que tem a FL/P com uma característica fenotípica (Gorlin *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2008). 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).

Durante a quarta semana de gestação, células da crista neural provenientes do tubo neural anterior migram para formar a primórdia facial. Dela surge o processo nasal medial e lateral que se fundem ao processo maxilar para formar a parte central do lábio superior, o palato primário e o nariz. O palato secundário começa a ser formado na sexta semana de gestação. Inicialmente, as placas palatinas do palato secundário aparecem como duas extensões no lado interno da maxila, ao longo da superfície lateral da língua. Na nona semana, ambas as placas palatinas sofrem uma rápida transformação horizontal, movendo-se sobre a língua e fusionando-se uma com a outra e com o septo nasal. Em seguida, 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 do palato primário e secundário e do septo nasal estão completos. Assim, o desenvolvimento do palato secundário em mamíferos divide o espaço oronasal em cavidades oral e nasal, permitindo que a mastigação e a respiração sejam realizadas simultaneamente (Sperber, 2002).

2.4. Etiologia

Mesmo representando um defeito congênito comum, a etiopatogenia das FL/PNS permanece incerta por ser difícil determinar o exato momento e a

razão precisa pela qual não houve coalescência dos processos que dão origem à face (Vieira, 2008). Isto é, em grande parte, reflexo da complexidade e da diversidade dos mecanismos moleculares envolvidos na embriogênese que são influenciados pela participação de múltiplos genes e de fatores ambientais (Carinci *et al.*, 2007; Vieira, 2008). Há uma enorme variedade de agentes teratogênicos externos que podem influenciar o desenvolvimento do lábio e do palato, embora poucos deles estejam comprovados. Apesar de existir grande controvérsia na literatura sobre a etiologia das FL/P, é bem aceito que elas correspondam a alterações multifatoriais, resultado da associação de fatores genéticos e ambientais (Zeiger & Beaty, 2002; Vieira *et al.*, 2005; Boyles *et al.*, 2006; Mostowska *et al.*, 2006; Brandalize *et al.*, 2007; Carinci *et al.*, 2007; Boyles *et al.*, 2008; Johnson & Little, 2008; Mills *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008a; Blik *et al.*, 2009; Boyles *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2009; Kistner *et al.*, 2009; Leite & Koifman, 2009).

Em comparação com outros defeitos congênitos de origem multifatorial, as fissuras orofaciais têm uma alta taxa de recorrência familiar (Lie *et al.*, 1994), embora um padrão clássico de herança mendeliana não seja sempre facilmente identificado (Natsume *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2008a). Fogh-Andersen (1946) 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 forte base genética para FP comparada com FL (Sivertsen *et al.*, 2008). Recentemente, Palmieri *et al.* (2008), em um estudo envolvendo 216 crianças com FL/PNS, observaram que 120 (55,56%) crianças apresentaram história familiar prévia de fissura. O trabalho do nosso grupo, avaliando a incidência familiar de FL/PNS em 185 pacientes, identificou que 35,13% dos indivíduos apresentaram histórico

familiar de FL/PNS, 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. A alta taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos fornece evidências convincentes para um componente genético forte para as fissuras orofaciais, mas não descarta a participação de outros fatores, como o ambiental, na gênese 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, FL/P e FP isolada podem ocorrer dentro de uma mesma família, sugerindo que existe, pelo menos, alguma sobreposição na etiologia desses 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 (VWS, OMIM #119300), que é 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, foram provenientes de casamentos consanguíneos e apresentavam anomalias congênitas, incluindo a FL/PNS (Rittler *et al.*, 2001). 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 estudo 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.*, 2011). 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).

2.4.1. Fatores Ambientais e Possível Interação com Polimorfismos Genéticos

Dados experimentais e epidemiológicos sugerem que fatores ambientais, incluindo dieta e suplementação vitamínica materna, alcoolismo, tabagismo, exposição à fumaça do tabaco, teratógenos no ambiente de trabalho e em casa e uso de alguns medicamentos durante o primeiro trimestre de gestação, podem ser importantes na etiologia das FL/PNS (Jamilian *et al.*, 2007; Vieira, 2008; Mossey *et al.*, 2009).

Sugere-se que o estado nutricional materno tenha algum papel na etiologia das FL/PNS (Krapels *et al.*, 2004a,b; van Rooij *et al.*, 2004). No entanto, a avaliação da ingestão alimentar e as medições bioquímicas do estado dietético representam um desafio e, geralmente, não são disponíveis, ou de fácil acesso, nas populações carentes, as quais abrigam a grande maioria dos casos de FL/PNS. Mesmo assim, uma alimentação rica em frutas e vegetais contendo folato, zinco, niacina, ácido ascórbico, ferro e magnésio, no período de periconcepção, parece reduzir o risco de FL/PNS (Krapels *et al.*, 2004a,b; Krapels *et al.*, 2006). Além disso, estudos demonstraram que a suplementação alimentar materna com multivitaminas no primeiro trimestre gestacional parece 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). Em adição, um estudo recente com a população chinesa demonstrou que variantes alélicas do gene *IRF6* podem influenciar o risco de FL/PNS por meio de interações com suplementação vitamínica e exposição ao tabaco (Wu *et al.*, 2010).

O ácido fólico, uma vitamina do complexo B encontrada naturalmente em muitos alimentos (fígado, alface, tomate, espinafre, entre outros), é fundamental para a formação e a manutenção de eritrócitos e leucócitos e na conversão de proteínas em energia. Essa vitamina também 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). Vários estudos demonstraram que a ingestão de ácido fólico por meio de suplementos vitamínicos um mês antes da gestação e durante o primeiro trimestre gestacional, período de formação e fusão do lábio e palato, parece ter um efeito protetor para o desenvolvimento de FL/PNS (van Rooij *et al.*, 2004; Canfield *et al.*, 2005; Yazdy *et al.*, 2007; Antony, 2007; Boyles *et al.*, 2008; Little *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2008; Jianyan *et al.*, 2009). No entanto, esses resultados não se reproduziram em alguns estudos (Shaw *et al.*, 2006; Bille *et al.*, 2007; Little *et al.*, 2008). Em um dos mais recentes estudos de meta-análise, Johnson e Little (2008) estimaram uma redução de aproximadamente 18% no risco de FL e FLP com o uso de suplementos contendo ácido fólico, mas nenhuma redução significativa para FP foi observada. Badovinac e colaboradores (2007) estimaram uma redução de aproximadamente 28% e 20% para o risco de FL/P e FP isolada, respectivamente, quando do uso de suplementos multivitamínicos. Em suma, embora muitos estudos sugiram um efeito benéfico do ácido fólico na diminuição da incidência de FL/PNS, os resultados são inconsistentes quanto a esse efeito, bem como se a proteção se estende a todos os tipos de fissura (Wehby & Murray, 2010).

Nos últimos anos, 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 (Bufalino *et al.*, 2010). Dos 29 polimorfismos investigados, 9 foram confirmados em nossa população, incluindo rs1801133 e rs2274976 do gene *MTHFR*; rs2236225, rs1950902,

rs10813 e rs17857382 do gene *MTHFD1*; rs1805087 e rs2229274 do gene *MTR*; e rs1051266 do gene *SLC19A1*, e 2 destes (rs2274976 e rs2236225) demonstraram resultados expressivos. A frequência do alelo variante do polimorfismo rs2274976 do gene *MTHFR* foi significativamente maior no grupo de mães de indivíduos com FL/PNS quando comparado com o grupo controle. O genótipo GA foi identificado em 15,8% das amostras do grupo controle, enquanto que 51,9% das amostras de mães com filhos afetados por FL/PNS apresentaram este genótipo. Mães carregando o alelo variante A (genótipo GA) exibiram um risco materno aumentado para ter um filho com FL/PNS como revelado pelo OR de 5,76 (95% CI: 3,32-9,99; $p=0,000001$). Interessantemente, entre as mães que não usaram suplementação vitamínica no 1º trimestre de gestação, o risco de ter um filho com FL/PNS foi aumentado para 8,34 (95% CI: 3,75-18,55; $p=0,000001$) na presença do genótipo GA deste polimorfismo comparado com as mães com o genótipo GG. Embora a análise não-restrita dos genótipos do polimorfismo rs2236225 do gene *MTHFD1* não revelou nenhuma diferença estatística, quando os genótipos GG e GA foram combinados e comparados contra o genótipo raro AA (análise no modelo genético recessivo), uma significativa associação foi observada. Mães homozigotas para este polimorfismo demonstraram um risco aumentado para ter um filho com FL/PNS comparado com mães carregando os genótipos GG ou GA (OR: 1,97; 95% CI: 1,07-3,62; $p=0,02$) e na ausência de suplementação vitamínica durante o 1º trimestre de gestação, este risco foi ainda maior (OR: 3,56; 95% CI: 1,29-9,82; $p=0,01$).

O consumo excessivo de bebidas alcoólicas durante o primeiro trimestre de gestação tem sido considerado um importante fator de risco para malformações craniofaciais (Lorente *et al.*, 2000; Spilson *et al.*, 2001; Zarante *et al.*, 2009). No entanto, a contribuição do álcool para o desenvolvimento de FL/PNS ainda é incerta, com alguns trabalhos demonstrando associação positiva (Romitti *et al.*, 1999; Lorente *et al.*, 2000; Chevrier *et al.*, 2005; DeRoo *et al.*, 2008) e outros não (Meyer *et al.*, 2003; Romitti *et al.*, 2007). Estudos realizados com animais e humanos demonstraram que tanto a frequência quanto a quantidade total de álcool consumida durante a gestação podem

apresentar um importante efeito teratogênico para o feto em desenvolvimento (Gladstone *et al.*, 1996; Sokol *et al.*, 2003). Em geral, os estudos que encontraram associação positiva entre o uso de álcool durante o primeiro trimestre de gestação e/ou durante a gravidez e o desenvolvimento de FL/PNS demonstraram um risco aumentado de 1,36 a 4 vezes entre mães que se enquadram em uma categoria de consumo elevado de álcool (média de ≥ 5 doses por ocasião) (Werler *et al.*, 1991; Munger *et al.*, 1996; Shaw & Lammer, 1999; Romitti *et al.*, 1999; Lorente *et al.*, 2000; DeRoo *et al.*, 2008). Interessantemente, um estudo recente sugeriu que a associação entre consumo de álcool no período de periconcepção e FL/PNS (particularmente as FP isoladas) pode ser influenciada pelo tipo de bebida (bebida destilada > vinhos > cerveja) e o uso de ácido fólico (Romitti *et al.*, 2007). Romitti e colaboradores (1999) identificaram um risco elevado para FLP quando a mãe consumia ≥ 4 doses por mês e o filho carregava um alelo variante no gene *MSX1*, o qual está correlacionado ao desenvolvimento craniofacial durante a embriogênese. Esses autores sugeriram que o desenvolvimento das FL/PNS pode ser influenciado pelas exposições maternas aos agentes teratogênicos, porém mais significativamente, pelas interações de tais exposições às variantes alélicas específicas (Romitti *et al.*, 1999). Chevrier *et al.* (2005) revelaram que uma variante polimórfica do gene *ADH1C* (responsável pelo metabolismo do etanol) em crianças parece ter um efeito protetor para o desenvolvimento de FL/PNS. No entanto, uma interação entre o genótipo do gene *ADH1C* e o consumo de álcool pela mãe não foi observada. Segundo DeRoo *et al.* (2008), esses resultados conflitantes são, em parte, decorrentes da dificuldade de padronização dos participantes do estudo, da mensuração da quantidade e do tempo de consumo do álcool e das interpretações dos resultados de forma arbitrária. Além disso, o contexto social e dietético relacionado ao consumo do álcool são variados e complexos e podem incluir efeitos modificadores e somatórios de nutrição, tabagismo, estresse e/ou uso de drogas (Mossey *et al.*, 2009).

O tabagismo materno durante o primeiro trimestre de gestação é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das

FL/PNS (Little *et al.*, 2004a, b; Honein *et al.*, 2007). 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 (Jianyan *et al.*, 2009). Honein e colaboradores (2007) observaram que o tabagismo materno contribui em 4% para o risco de desenvolvimento de todos os tipos de FL/PNS e em 12% para os casos de FLP bilateral. Além disso, é sugerido que o risco aumenta com o número de cigarros consumidos durante a gestação (Lorente *et al.*, 2000; Little *et al.*, 2004a). Embora seja bem aceito que o consumo de tabaco durante a gestação aumenta o risco de FL/PNS, alguns poucos estudos falharam em encontrar tal associação (Beaty *et al.*, 1997; Chevrier *et al.*, 2008; Zarante *et al.*, 2009). Uma interação sinérgica entre uma variante polimórfica do gene *TGFA* e o consumo de tabaco durante a gestação no risco para o desenvolvimento das FL/PNS foi observada por Hwang e colaboradores (1995), mas investigações recentes falharam, também, ao tentar encontrar tal correlação (revisado por Zeiger *et al.*, 2005; Chevrier *et al.*, 2008). Recentemente, alguns estudos avaliaram a existência de uma interação entre tabagismo e polimorfismos em genes envolvidos nas vias de desintoxicação metabólica de componentes do tabaco no desenvolvimento das FL/PNS (Shi *et al.*, 2007; Chevrier *et al.*, 2008). Entre esses genes, *CYP* e *NAT* (enzimas relacionadas com o metabolismo de uma ampla variedade de agentes tóxicos e carcinógenos) e *GST* (enzima responsável pela desintoxicação de vários compostos orgânicos) foram avaliados, e os resultados foram inconclusivos (van Rooij *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2007; Chevrier *et al.*, 2008; Lie *et al.*, 2008). No entanto, uma interação entre tabagismo materno e a presença de uma deleção no gene *GSTT1* (*GSTT1*-nulo) observada em duas diferentes populações (Iowa e Dinamarca) de pacientes com FL/PNS foi significativa. *GSTT1* catalisa a conjugação da glutatona reduzida, um antioxidante que protege as células de toxinas como os radicais livres que são causados pelo fumo. A análise das informações indicou que, se uma mulher grávida fumar 15 cigarros ou mais por dia, as chances de seu feto *GSTT1*-nulo desenvolver FL/PNS aumentam em quase 20 vezes (Shi *et al.*, 2007).

A exposição ocupacional materna a solventes orgânicos e à exposição dos pais a produtos químicos agrícolas tem sido associada, de forma inconsistente, à FL/PNS (Garcia, 1998; Shaw *et al.*, 2003). O uso de medicamentos durante o primeiro trimestre de gestação, especialmente corticóides, anticonvulsivantes (diazepam, fenitoína e fenobarbital), nifedipina e antifolatos, também é sugerido ser um fator de risco para o nascimento de uma criança com FL/PNS (Dravet *et al.*, 1992; Rodriguez-Pinilla & Martinez-Frias, 1998; Hernandez-Diaz *et al.*, 2000; Carmichael *et al.*, 2007; Holmes *et al.*, 2008; Zarante *et al.*, 2009). Enfermidades crônicas e condições sistêmicas da mãe durante a gestação, como diabetes e obesidade, também parecem estar associadas com um maior risco de ter um filho com FL/PNS, no entanto o exato mecanismo responsável por essas doenças não está bem esclarecido (Spilson *et al.*, 2001; Cedergren & Källén, 2005).

A idade materna é considerada um 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/PNS comparado a mães com idade entre 25 e 29 anos (Shaw *et al.*, 1991). Estudo 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 com mulheres de 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-Davilla *et al.*, 2003; Jamilian *et al.*, 2007).

2.4.2. Fatores Genéticos

Muitos estudos genéticos utilizando diferentes estratégias, incluindo estudos de ligação, caso-controle ou com trios, sequenciamento direto do DNA e mais recentemente, estudos de associação de larga escala genômica

(GWAS), que são baseados na comparação de vários polimorfismos comuns entre casos e controles, identificaram a maior parte dos genes e regiões cromossômicas candidatos à etiologia das FL/PNS que conhecemos atualmente (Dixon *et al.*, 2011; Kohli & Kohli, 2012; Rahimov *et al.*, 2012; Stuppia *et al.*, 2012). Em particular, os recentes GWAS abrangendo diversas populações revelaram os polimorfismos situados nos *loci* 1p22.1 (rs560426) (Mostowska *et al.*, 2012), 1q32 (rs2013162) (Marazita *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010, Park *et al.*, 2007), 8q24 (rs987525 e rs1530300) (Grant *et al.*, 2009; Birnbaum *et al.*, 2009; Mostowska *et al.*, 2010), 9q22 (rs1443434 e rs3758249) (Moreno *et al.*, 2009), 10q25.3 (rs7078160) (Mangold *et al.*, 2010, Nikopensius *et al.*, 2009), 18q22 (rs17085106) (Grant *et al.*, 2009) e 20q12 (rs13041247) (Beaty *et al.*, 2010) como marcadores de suscetibilidade ao desenvolvimento de FL/PNS.

Polimorfismo rs560426

O polimorfismo rs560426 situa-se próximo ao gene *ABCA4*. Este gene codifica uma proteína associada à membrana, que transporta várias moléculas através das membranas intra e extracelulares (Molday *et al.*, 2009). Enquanto *ABCA4* foi inicialmente encontrado apenas expresso em bastonetes e cones fotorreceptores da retina de vertebrados (Azarian & Travis, 1997), estudos posteriores demonstraram a expressão em cérebro de murinos (Bhongsatiern *et al.*, 2005; Tachikawa *et al.*, 2005). Mutações em *ABCA4* estão associadas às doenças autossômicas degenerativas da retina incluindo degeneração macular de Stargardt (OMIM #248200), distrofia de cone e bastonetes (OMIM #601691) e retinite pigmentosa (OMIM #601718). Expressão de *ABCA4* não foi detectada no palato de embriões de camundongo (Beaty *et al.*, 2010).

O primeiro GWAS a demonstrar a correlação do polimorfismo rs560426 com FL/PNS foi publicado em 2010 por Beaty e colaboradores (2010). Neste estudo, com a participação de trios de países da América do Norte, Europa e Ásia, rs560426 foi significativamente identificado como um marcador de risco para FL/PNS na amostra como um todo e quando

estratificado para amostras de pacientes de origem européia e asiática (Beaty *et al.*, 2010). Posteriormente, Yuan e colaboradores (2011) validaram os resultados originais em um grupo de FL/PNS de pacientes com origem hispânica, mas o mesmo não foi evidenciado com uma amostra de pacientes classificados como caucasianos não-hispânicos (moradores do estado do Texas-EUA). Ausência de associação do polimorfismo rs560426 com suscetibilidade a FL/PNS foi também reportada em estudos com populações da Nigéria (Butali *et al.*, 2011), China (Pan *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012) e Polônia (Mostowska *et al.*, 2012).

Polimorfismo rs2013162

O polimorfismo rs2013162 situa-se no quinto exon do gene *IRF6*, no *locus* cromossômico 1q32. Mutações em *IRF6* são causadoras de VWS (Síndrome de van der Woude, OMIM #119300), uma alteração autossômica dominante caracterizada pela presença de FL/P em associação com fossetas no lábio inferior (Kondo *et al.*, 2002; Paranaíba *et al.*, 2008) e da síndrome pterígiopoplíteia (PPS, OMIM #119500), que é caracterizada por anomalias da pele, genitália e face, incluindo FL/P (Froster-Iskenius, 1990). 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 (820G>A, nucleotídeo 820 variando de G para A), que resulta na substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 274 da sequência de aminoácidos (Val274Ile) da estrutura protéica de *IRF6*, foi associado de forma significativa às FL/PNS (Jugessur *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009). Em adição a esses achados, Rahimov *et al.* (2008) demonstraram uma forte associação entre FL e o polimorfismo rs642961 do gene *IRF6* (G>A que altera o sítio de ligação do fator de transcrição AP-2 α na região promotora de *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 do

genótipo variante GA do 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%). Juntos, esses 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.*, 2010).

Em 2009, Marazita e colaboradores realizaram um GWAS com 820 famílias contendo, pelo menos, um indivíduo com FL/PNS de 6 países (Filipinas, Colômbia, China, Índia, Turquia e Estados Unidos) e encontraram um forte correlação entre o polimorfismo rs2013162 e FL/PNS, especificamente com FL e FLP. Interessantemente, este polimorfismo demonstrou não estar em desequilíbrio de ligação com os 2 polimorfismos (rs2235371 e rs642961) originalmente associados com FL/PNS. Previamente a este primeiro GWAS, Park *et al.* (2007) avaliaram 13 polimorfismos em *IRF6* e encontraram que a presença do alelo C do polimorfismo rs2013162 foi significativamente associado com um maior risco de FL/PNS em populações de Tailândia e Cingapura, mas não nas populações de origem européia e americana. Huang e colaboradores (2009) não encontraram uma associação do polimorfismo rs2013162 em uma população do oeste da China, enquanto que uma significativa associação em populações da Bélgica, Itália e Estados Unidos foi observada para este mesmo polimorfismo (Ghassibé *et al.*, 2005; Scapoli *et al.*, 2005; Blanton *et al.*, 2005). Salahshourifar e colaboradores (2012) também encontraram associação do polimorfismo rs2013162 quando analisaram diversos polimorfismos contidos em *IRF6* em um estudo com pacientes da Malásia. Este polimorfismo obteve significância no estudo de Beaty e colaboradores (2010) nos trios de pais e filhos como um todo (50% asiáticos, 45% europeus e 5% africanos e outras ancestralidades) e também nos trios de origem asiática. Já outro estudo realizado com uma população irlandesa não encontrou associação deste polimorfismo com FL/PNS (Carter *et al.*, 2010).

Polimorfismos rs987525 e rs1530300

Os polimorfismos rs987525 e rs1530300 estão localizados na região cromossômica 8q24. Esta região vem sendo associada à FL/PNS em diversos estudos (Mostowska *et al.*, 2010; Grant *et al.*, 2009; Birnbaum *et al.*, 2009; Yildirim *et al.*, 2012). Em um estudo realizado numa população da Europa Central foi analisada uma região de 640 kpb do cromossomo 8q24.21 e realizada a genotipagem para 146 polimorfismos, sendo que o rs987525 foi o mais significativo em toda a amostra (Birnbaum *et al.*, 2009). A região 8q24.21 está associada ao desenvolvimento de vários tipos de cânceres (Tomlinson *et al.*, 2007; Ghousaini *et al.*, 2008). No entanto, a região associada ao câncer está localizada a aproximadamente 1 Kpb da região de 640 kpb que tem demonstrado associação com FL/PNS. Os polimorfismos rs987525 e rs1530300 foram significativamente associados a FL/PNS no estudo de Grant e colaboradores (2009) realizado com uma população de descendência europeia residindo na Filadélfia, EUA. Mostowska e colaboradores (2010) também encontraram associação de rs987525 com FL/PNS na população polonesa que estudaram. Ao estudar uma população mesoamericana (de descendência Maia), Rojas-Martinez e colaboradores (2010) encontraram uma significativa associação entre rs987525 e FL/PNS. Os polimorfismos rs98757 e rs1530300, também, foram significativamente associados com FL/PNS em estudos na Estônia e Lituânia (Nikopensius *et al.*, 2009) e Polônia (Mostowska *et al.*, 2010). Por outro lado, Butali e colaboradores (2011) não encontraram associação entre o polimorfismo rs987525 e FL/PNS em uma população da Nigéria, assim como, não foi encontrada associação deste polimorfismo em uma população do Sul da China (Xu *et al.*, 2011). O estudo realizado por Blanton e colaboradores (2010) analisou famílias com descendência hispânica e não-hispânica branca, sendo 120 famílias com indivíduos com FL/PNS (83 não-hispânicas brancas e 37 hispânicas) e 325 trios controles (234 não-hispânicas brancos e 91 hispânicos), revelando uma significativa correlação entre os polimorfismos rs1530300 e rs987525 e FL/PNS e entre estes polimorfismos e o polimorfismo rs642961 situado no gene *IRF6*. Já a

associação entre rs642961 e rs987525 não foi encontrada no estudo de Birnbaum e colaboradores (2009).

Os mecanismos biológicos da associação entre variantes em 8q24 e FL/PNS são desconhecidas. É possível que rs987525 ou um polimorfismo em desequilíbrio de ligação afeta potenciadores tecido-específicos, alterando a expressão de um ou mais genes. Até o momento, genes mapeados para a região próxima a 8q24 inclui os genes *MYC* e *GSDMC*, os quais codificam as proteínas *myc* e *melanoma-derived leucine zipper-containing extranuclear factor*, respectivamente. A alta significância da associação de rs987525 com FL/PNS faz a região 8q24 um dos principais *loci* de susceptibilidade nas populações europeias (Mostowska *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2012).

Polimorfismos rs1443434 e rs3758249

Embora os dois polimorfismos estejam no *locus* cromossômico 9q22, o polimorfismo rs1443434 situa-se dentro do gene *FOXE1*, enquanto que o polimorfismo rs3758240 está localizado a 3,7 Kpb a jusante de *FOXE1* no *locus* cromossômico 9q22. A família do gene *forhead* (*Fox*), originalmente identificada na *Drosophila*, codifica fatores de transcrição com uma cadeia de ligação ao DNA altamente conservada de 100 aminoácidos chamada “domínio *forkhead*” e regula diversos processos de desenvolvimento em eucariotos (Lehman *et al.*, 2003). Nos seres humanos, as mutações do gene que codifica o fator de transcrição de tireóide-2 (*TTF-2* ou *FOXE1*) estão associadas ao hipotireoidismo congênito, agenesia da tireóide e fenda palatina (Castanet *et al.* 2002;. Dathan *et al.* 2002). A síndrome de Bamforth (OMIM #241850), caracterizada por agenesia do palato ou palato fissurado, cabelo espetado e atresia do canal anal, é causada por mutações em *FOXE1* (Meng *et al.*, 2012). No entanto, a regulação molecular e genética exercida por *FOXE1* é em grande parte desconhecida (Meng *et al.*, 2012). No estudo de Meng e colaboradores (2012), camundongos *TTF-2* (ou *FOXE1*) transgênicos exibiram um fenótipo de FP. Além disso, verificou-se que *TTF-2* foi altamente expresso no epitélio do bordo medial do embrião do camundongo transgênico. Estas observações sugerem que alterações na expressão de *TTF-2* durante a palatogênese pode

contribuir para a formação de fissuras. Venza e colaboradores (2009) observaram que 45% dos pacientes com FP apresentavam um polimorfismo homozigoto C(-1204)G que impedia a ligação de *MYF-5* a região promotora do gene *FOXE1*, afetando a sua expressão gênica. Como *MYF-5* regula o sistema músculo-esquelético durante o desenvolvimento craniofacial e a fusão do palato primário e secundário, os resultados apresentados sugerem fortemente um envolvimento significativo de *FOXE1* na ocorrência de FP.

O primeiro estudo a demonstrar associação de rs1443434 com FL/PNS foi realizado com 861 famílias com FL/PNS de 6 países diferentes (China, Colômbia, EUA, Índia, Filipinas e Turquia) (Marazita *et al.*, 2009). Embora como um marcador único o polimorfismo rs3758249 não tenha demonstrado um resultado significativo, este marcador compunha o bloco de haplótipos da região 9q22 que demonstrou uma significativa associação com FL/PNS (Marazita *et al.*, 2009). A associação do polimorfismo rs1443434 com FL/PNS foi posteriormente confirmada em populações da Colômbia, EUA e Filipinas (Moreno *et al.*, 2009), mas nenhuma correlação foi observada em pacientes da Polônia (Mostowska *et al.*, 2010), Nigéria (Butali *et al.*, 2011) e famílias dos Estados Unidos, Espanha, Turquia, Guatemala e China (Letra *et al.*, 2010).

Polimorfismo rs7078160

O polimorfismo rs7078160 situa-se próximo ao gene *VAX1*. Este gene está associado ao desenvolvimento ocular e em um estudo recente foi demonstrada sua participação como um gene causador de anoftalmia/microftalmia (Slavotinek *et al.*, 2012). *VAX1* regula as propriedades de orientação de um conjunto de células da linha média anterior que orquestram as trajetórias dos axônios no desenvolvimento do prosencéfalo de mamíferos (Bertuzzi *et al.*, 1999). Além de possuir papel na formação do prosencéfalo, *VAX1* também está relacionada ao desenvolvimento do nervo óptico (Hallonet *et al.*, 1999). As ações de *VAX1* é mediada por “sonic hedgehog” e suprimida pela proteína morfogenética 4 (BMP4), moléculas que regulam a palatogênese de mamíferos (Zhang *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2010).

O primeiro estudo que demonstrou a associação do polimorfismo rs7078160 em *VAX1* com FL/PNS foi conduzido com uma ampla amostra de origem europeia (Mangold *et al.*, 2010). Posteriormente, estudos com populações de origem mesoamericana (de descendência Maia) (Rojas-Martinez *et al.*, 2010), polonesa (Mostowska *et al.*, 2012) e da Estônia (Nikopensius *et al.*, 2010) corroboraram tal achado. Entretanto, o mesmo resultado não foi encontrado em um estudo realizado em uma população chinesa (Pan *et al.*, 2011).

Polimorfismo rs17085106

O polimorfismo rs17085106 está localizado no *locus* cromossômico 18q22. O cromossomo 18 está associado à síndrome do 18q- ou síndrome de Grouchy (OMIM #601808), que é caracterizada por retardo mental variando de leve a moderado, atraso no desenvolvimento, deficiência do hormônio do crescimento (OMIM #139250), dimorfismo craniofacial, perda auditiva, anormalidades na massa branca do cérebro, anomalias dos membros, malformações do aparelho geniturinário, defeitos no coração e deficiência de IgA (OMIM #137100). As malformações orofaciais são uma característica comum da síndrome e incluem FL/P, hipoplasia do terço médio da face, ângulo da boca voltado para baixo, prognatismo, ponte nasal plana, fissuras palpebrais oblíquas, orelhas mal formadas e conduto auditivo externo atrésico ou estreito (OMIM #607842). Dois *loci* localizados no braço longo do cromossomo 18 podem contribuir para a expressão das fendas orofaciais em pacientes com esta síndrome (Dostal *et al.*, 2009). A primeira região está localizada em 18q21.1 e foi identificada em famílias europeias segregando FL/P em um padrão autossômico. A segunda região, com 5,4 Mpb, foi descrita em 18q22.3 (Marazita *et al.*, 2002b). Esta região foi mapeada entre marcadores genéticos ATA82B02 e D18S844 como resultado da análise de ligação do genoma em famílias chinesas com FL/PNS sem alteração do cariótipo. Importante notar que ambas as regiões críticas para FL/P em indivíduos 18q- e para FL/PNS em famílias chinesas, residem em regiões de sobreposição dentro da mesma banda cromossômica 18q22.3.

Em um estudo realizado por Grant e colaboradores (2009) com uma população de descendência europeia da Filadélfia, o polimorfismo rs17085106 obteve forte associação a FL/PNS com um valor de OR de 4,07 (95% IC: 2,37-7,00; p=0,019). Nenhum estudo validou tal achado até o momento.

Polimorfismo rs13041247

O polimorfismo rs13041247 situa-se próximo ao gene *MAFB*. A família do fator de transcrição MAF apresenta função de zíper de leucina (Wang *et al.*, 1999). Os membros desta família são nomeados após v-Maf, o componente oncogênico do retrovírus aviário AS42 isolado originalmente de um fibrossarcoma músculo-aponeurótico espontâneo (*MAF*) de frango. Análise em camundongos demonstrou um papel importante de *MAFB* e *MAFA* na formação e função das células β das ilhotas pancreáticas, com *MAFB* sendo necessário durante o seu desenvolvimento (Hang & Stein, 2011). *MAFB* também controla a identidade segmentar do rombencéfalo (Hang & Stein, 2011). Além disso, *MAFB* desempenha papéis cruciais em uma variedade de outros processos de diferenciação celular, inclusive em podócitos renais, macrófagos, timo, interneurônios e sistema hematopoiético (Yang & Cvekl, 2007). As proteínas da família MAF podem transformar células primárias e servem como oncogenes em neoplasias malignas humanas, especificamente a proteína de *MAFB* demonstra estar associada ao mieloma múltiplo (Hang & Stein, 2011).

Beaty e colaboradores (2010) foram os primeiros a demonstrar a associação do polimorfismo rs13041247 com FL/PNS em indivíduos de ancestralidade asiática. A associação deste polimorfismo com populações de origem asiática foi posteriormente confirmada (Pan *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012), enquanto que não foi encontrada significância com uma população da Nigéria (Butali *et al.*, 2011).

2.5. Ancestralidade e a sua Influência em Estudos com Polimorfismos Genéticos

Em países com uma história recente de imigração e miscigenação, como o Brasil, a composição (mistura) étnica pode ter um forte efeito sobre a contribuição genética em doenças multifatoriais como é o caso da FL/PNS. A população brasileira foi formada por sucessivas ondas migratórias. Povos ameríndios ocupavam o território brasileiro quando os portugueses chegaram em 1500 e colonizaram o país e, entre os séculos XVI e XIX, os africanos foram trazidos ao Brasil como escravos. Além dos portugueses, outras ondas migratórias ocorreram nos séculos 19 e 20, principalmente com a vinda de italianos, alemães e espanhóis (Salzano & Bortolini, 2002). Todos estes eventos migratórios contribuíram para a formação de uma população multiétnica e altamente miscigenada. Essa heterogeneidade foi documentada em vários estudos genéticos que utilizaram marcadores uniparentais ou autossômicos para demonstrar um típico (embora não seja um padrão uniforme) perfil tri-étnico (Europeu, Africano e Ameríndio) da população brasileira. Sendo um país com dimensões geográficas expressivas, o processo de colonização e imigração não correu de maneira uniforme quando se compara as diferentes diversas regiões geográficas do país. Enquanto que no Nordeste do país a contribuição africana é alta e na região Norte a contribuição dos nativos americanos é marcante, a influência de ameríndios e africanos na região Sul é bem menos pronunciada (Salzano & Bortolini, 2002; Callegari-Jacques *et al.*, 2003; Zembruski *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2009). Contudo, em um estudo recente foi demonstrado que independente da região do país, a contribuição europeia é a mais prevalente provavelmente devido a imigração de 6 milhões de europeus durante os séculos 19 e 20 em um fenômeno descrito com “branqueamento” do Brasil (Pena *et al.*, 2011).

Considerando as doenças de origem multifatorial como as FL/PNS, a principal influência da composição genética da população está em estudos caso-controle, que são geralmente os mais utilizados. Diferenças entre os grupos podem induzir interpretações errôneas dos resultados, dificultando a visão global e o melhor conhecimento da doença. Tradicionalmente os estudos

tendem a controlar os grupos (pareá-los) quanto à raça/etnia pela cor de pele. Contudo, nem a cor da pele ou características associadas (estilo do cabelo, formato do nariz e espessura do lábio) nem a região de origem podem adequadamente diferenciar uma população miscigenada (Parra *et al.*, 1998; Parra *et al.*, 2003; Pena & Bortolini, 2004). Por exemplo, 87% dos brasileiros apresentam mais de 10% de ancestralidade africana e 48% dos afrodescendentes brasileiros se autoclassificam como brancos (Parra *et al.*, 1998; Parra *et al.*, 2003; Pena & Bortolini, 2004). Um bom exemplo que a etnia tem papel importante na relação polimorfismo e FL/PNS é *MTHFR*, em particular o polimorfismo rs1801133. Contudo, existem muitos outros exemplos que poderiam ter sido utilizados para explicar tal influência.

O polimorfismo rs1801133 resulta na substituição de um aminoácido alanina por uma valina na posição 222 do produto protéico (c.677C>T, Ala222Val) e na presença do alelo T, a atividade da enzima *MTHFR* é reduzida, diminuindo a conversão do 5,10-CH₂THF em 5-CH₃THF e, conseqüentemente, aumentando a quantidade de 5,10-CH₂THF disponível para a síntese de pirimidinas, reduzindo desta forma possíveis danos na síntese de DNA (Brockton, 2006). Este polimorfismo tem sido amplamente estudado como fator de risco para FL/PNS, porém os resultados são controversos. A presença do alelo variante T aumentou, reduziu ou até mesmo não apresentou nenhuma correlação com o desenvolvimento de FL/PNS em diferentes populações e as diferenças entre os grupos étnicos podem ter contribuído para tal divergência de resultados. Zhu e colaboradores (2006) revelaram uma associação distinta deste polimorfismo entre populações chinesas com etnias diferentes. Uma associação entre o alelo T e o risco de desenvolvimento de fissura foi observada na população do Norte da China, mas nenhuma correlação foi observada na população sulista. Este mesmo efeito é observado em grupos europeus com etnia diferentes. Enquanto o polimorfismo rs180113 não apresentou nenhum efeito na população da Europa Central (origem em países como Alemanha, Áustria, Suíça, Bélgica, Holanda, Luxemburgo, Polônia, Republica Checa, Eslováquia, entre outros) (Reutter *et al.*, 2008), uma forte associação entre o alelo raro T e um risco aumentado para

FL/PNS foi observada na Itália (Pezzetti *et al.*, 2004). Uma ausência de associação também foi reportada em pacientes com FL/PNS da Noruega, um país escandinavo com baixa miscigenação étnica (Boyles *et al.*, 2008). Uma falta de associação entre a variante T e o surgimento de FL/PNS também foi demonstrado em 2 estudos com populações brasileiras (Gaspar *et al.*, 1999; Brandalize *et al.*, 2007).

O polimorfismo rs987525 em 8q24 é outro bom exemplo da influência étnica na associação com FL/PNS. A presença do alelo de risco C neste polimorfismo foi significativamente correlacionada com um risco para desenvolvimento de FL/PNS em indivíduos de origem européia, incluindo Alemanha, Estônia, Lituânia e Polônia e descendentes de europeus morando nos Estados Unidos (Birnbbaum *et al.*, 2009; Grant *et al.*, 2009; Nikopensius *et al.*, 2009; Beaty *et al.*, 2010; Mostowska *et al.*, 2010). Por outro lado, indivíduos de origem asiática ou africana não demonstram risco aumentado na presença do alelo de risco C (Beaty *et al.*, 2010; Hikida *et al.*, 2011; Weatherley-White *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011).

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste projeto foi identificar polimorfismos genéticos de predisposição as FL/PNS. Para tanto, nos propusemos a desenvolver um estudo caso-controle com os seguintes objetivos específicos:

1. Comparar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos rs987525, rs1443434, rs3758249, rs1530300, rs2013162, rs7078160, rs17085106, rs560426 e rs13041247 entre indivíduos com FL/PNS e indivíduos clinicamente normais.

2. Caracterizar as amostras do grupo controle e de pacientes com FL/PNS quanto à ancestralidade européia, africana ou indígena por meio de um painel de INDELs e corrigir o efeito da miscigenação étnica da população na associação com os polimorfismos genéticos.

4. MATERIAIS 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, após deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP (processo 122/2010; anexo 1).

4.2. População

As amostras foram divididas em 2 grupos: grupo controle, que foi constituído por amostras de 338 indivíduos clinicamente normais, e grupo FL/PNS, composto por amostras de 345 pacientes com FL/PNS. Ambos os grupos apresentavam indivíduos sem histórico familiar de síndromes, FL/P ou ainda qualquer alteração congênita. Todas as amostras dos pacientes foram obtidas na Universidade de Alfenas (UNIFENAS), Minas Gerais. As amostras do grupo FL/PNS foram obtidas no Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de Alfenas (Centro Pró-Sorriso - Centrinho) durante o tratamento odontológico oferecido aos indivíduos fissurados. Todos os pacientes deste grupo foram examinados pela Equipe Multidisciplinar (pediatra, cirurgião-plástico, estomatologistas, fonoaudiólogo, psicólogo, fisioterapeuta, enfermeiras, nutricionistas, ortodontistas) do referido Centro, não revelando outra alteração sistêmica em associação à FL/PNS. A coleta das amostras do grupo controle procedeu-se na Clínica de Graduação desta mesma instituição durante o tratamento odontológico, oferecido a pacientes que procuraram por atendimento.

4.3. Seleção dos Polimorfismos Gênicos

Nove polimorfismos genéticos foram selecionados para serem investigados neste estudo pelo fato de terem sido fortemente correlacionados às FL/PNS em estudos prévios (Birnbbaum *et al.*, 2009; Grant *et al.*, 2009; Mangold *et al.*, 2009; Marazita *et al.*, 2009; Mangold *et al.*, 2010; Beaty *et al.*, 2010), por apresentarem distribuição diferencial dos alelos em diferentes populações e por não existirem estudos na literatura envolvendo a população

brasileira. As características dos polimorfismos genéticos deste estudo estão descritas na Tabela 1, incluindo a frequência de cada alelo ancestral em 3 populações de etnias diferentes, conforme o banco genético (HapMap).

4.4. Coleta das Amostras para Análise dos Polimorfismos

Previamente à coleta, todos os voluntários ou seus responsáveis foram informados do propósito do estudo e solicitados à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido de participação. As amostras de células bucais foram coletadas por meio 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, a cada tubo foi adicionada água destilada e deionizada autoclavada q.s.p. 15 ml. 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 ressuspensionado 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, foram adicionados 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 ressuspensionado 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. Genotipagem pelo Método de Discriminação Alélica com Sondas Fluorescentes

A análise foi realizada no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems) em uma reação de 8 µl contendo 4 µl de 2x Genotyping Master Mix, 0,2 µl da mistura de primers e sondas e 2 ng DNA, os quais foram diluídos em 3,8 µl de água livre de DNase e RNase. Os parâmetros de amplificação foram: 1 ciclo de 30 s a 60°C e 10 min a 95°C (desnaturação inicial) e 40 ciclos de 15 s a 92°C e 1 min a 60°C (estágio de amplificação), os quais foram seguidos por 1 ciclo de 30 s a 60°C. Para validação dos resultados, a reação para cada polimorfismo foi repetida em 10% das amostras que foram aleatoriamente escolhidas.

4.7. Genotipagem dos Marcadores de Ancestralidade

Os 40 polimorfismos de inserção e deleção informativos de ancestralidade descritos por Bastos-Rodrigues e colaboradores (2006) foram utilizados neste estudo. Em essência, as reações de PCR multiplex foram realizadas com 5 a 7 pares de primers por reação, escolhidos com base no tamanho dos alelos. A cada primer forward foi adicionada uma cauda de M13 (Schuelke, 2000) e um primer forward complementar a M13 ligado ao fluoróforo FAM foi também utilizado. A reação, de volume final de 10 µl, consistiu de 1 µl 10X PCR Buffer, 0,8 µl dNTPs (2,5 mM), 0,2 µl Taq polimerase (5 U/ml), 4,95 µl H₂O Milli-Q, 2 µl DNA (50 ng) e 0,75 µl da mistura de primers. A mistura de primers continha 33 µM da mistura de primers forward específicos (partes iguais de cada um), 100 µM do primer forward complementar a M13 ligado ao fluoróforo FAM e 100 µM da mistura de primers reverse (partes iguais). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 45 s e 72°C 45 s, 9 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 45 s e 72°C 45 s, seguido por final extensão a 72°C por 30 min. Após as reações de amplificação, os produtos foram diluídos para subsequente análise no sequenciador automático ABI3500 DNA Analyser (Applied Biosystems). A reação consistirá em 8,925 µl de Formamida HI-DI, 0,075 µl do marcador de peso molecular GS600 e 2 µl do produto da PCR diluído 10 vezes.

A análise dos fragmentos foi realizada com o programa GeneMapper® Software Version 4.0.

4.8. Análise Estatística

A existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada em toda a amostra e individualmente por grupo (Rodriguez *et al.*, 2009) e as diferenças na frequência dos alelos e genótipos em um modo de herança não-restrito foram comparadas pelo teste de qui-quadrado. O cálculo do risco de recorrência (*odds ratio*, OR) com intervalo de confiança (IC) em 95% foi realizado para estimar o risco de cada fator na ocorrência da FL/PNS (Prism 6 for Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Análises de haplótipos foram calculadas a partir dos dados primários dos genótipos com o uso do Programa Haploview (<http://broad.mit.edu/mpg/haploview>).

Para a análise da correção de ancestralidade, os programas Structure e STRAT foram utilizados. O primeiro investiga a presença de estrutura populacional e infere por análise bayesiana a presença de componentes de diferentes populações ancestrais nos indivíduos (Pritchard *et al.* 2000a). Em nossa análise, foi assumido uma população com 3 origens (K=3), Européia, Africana e Ameríndia. O programa STRAT utiliza os dados gerados pelo Structure referentes às contribuições das populações ancestrais para cada indivíduo para aplicar correção estatística ao teste de associação entre casos e controles (Pritchard *et al.* 2000b).

Em nossas comparações, $p \leq 0,05$ foi utilizado como indicativo de diferença estatisticamente significativa.

Tabela 1. Descrição dos polimorfismos genéticos deste estudo.

Polimorfismo	Cromossomo	Gene	Alelos	Frequência do Alelo Ancestral		
				População Européia ^a	População Asiática ^b	População Africana ^c
rs560426	1p22.1	<i>ABCA4</i> *	Ancestral: A Variante: G	49,6%	67,4%	53,1%
rs2013162	1q32	<i>IRF6</i>	Ancestral: C Variante: A	65,2%	50,0%	75,2%
rs987525	8q24	Região intergênica	Ancestral: A Variante: C	22,1%	4,8%	65,5%
rs1530300	8q24	Região intergênica	Ancestral: T Variante: C	69,2%	97,7%	88,9%
rs1443434	9q22	<i>FOXE1</i>	Ancestral: G Variante: T	42,0%	19,8%	30,1%
rs3758249	9q22	<i>FOXE1</i> *	Ancestral: A Variante: G	46,6%	18,9%	27,5%
rs7078160	10q25.3	<i>VAX1</i> *	Ancestral: G Variante: A	83,2%	57,0%	79,2%
rs17085106	18q22		Ancestral: G Variante: T	98,6%	100%	80,5%
rs13041247	20q12	<i>MAFB</i> *	Ambiguidade: T Variante: C	59,7%	41,9%	77,4%

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

^a HapMap-CEU

^b HapMap-HCB

^c HapMap-YRI

* Região intergênica, próxima ao gene

5. RESULTADOS

5.1. Características Gerais dos Grupos

O grupo FL/PNS foi composto por 345 pacientes com FL/PNS, dos quais 186 (54%) foram do gênero masculino e 159 (46%) do gênero feminino. Quanto ao tipo de fissura, 197 (57,1%) pacientes apresentaram FLP, 79 (20%) FL e 69 (%) FP. O grupo controle foi composto por 338 indivíduos normais, dos quais 187 (55,3%) foram do gênero feminino e 151 (44,7%) do gênero masculino.

5.2. Frequência Alélica e Genotípica dos Polimorfismos

Os 2 alelos e os 3 possíveis genótipos de cada um dos 9 polimorfismos deste estudo foram encontrados na amostra estudada (Tabelas 2 e 3). A Tabela 4 demonstra o resultado do cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg para a amostra como um todo e individualmente para cada um dos grupos. Uma significativa correlação entre os polimorfismos rs987525, rs560426 e rs1530300 e o grupo FL/PNS foi observada.

Para o polimorfismo rs987525, o alelo C foi o mais frequente na população brasileira, sendo encontrado em uma frequência significativamente maior no grupo controle (72%) quando comparado com o grupo FL/PNS (59,1%) (Tabela 2). Assim, comparado ao alelo C, a presença do alelo A demonstrou ser um fator de risco para FL/PNS com um OR de 1,78 (95% IC: 1,42-2,74; $p=0,0000001$). Isso foi confirmado pelas frequências dos genótipos CA e AA foram significativamente maior no grupo FL/PNS em comparação com o grupo controle ($p=0,00004$; Tabela 3). O risco de ocorrência de FL/PNS para um indivíduo heterozigoto (CA) foi de 1,98 vezes (95% IC: 1,42-2,47) maior comparado com um indivíduo homozigoto CC, enquanto que o risco para um indivíduo AA foi ainda maior, OR de 2,73 (95% IC: 1,67-4,46; Tabela 3). A distribuição dos genótipos para o polimorfismo rs987525 respeitou o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4).

O alelo A do polimorfismo rs560426 foi o mais comum na população estudada com uma frequência de aproximadamente 55% (Tabela 2). O alelo G

deste polimorfismo foi encontrado em uma frequência significativamente maior no grupo FL/PNS que no grupo controle ($p=0,0008$), gerando um OR de 1,44 (IC 95%: 1,16-1,78; Tabela 2). O genótipo heterozigoto AG foi o mais prevalente na população estudada, sendo encontrado em uma frequência significativamente maior no grupo FL/PNS comparado ao grupo controle ($p=0,03$; OR: 1,46; 95% IC: 1,03-2,07). O genótipo GG também foi significativamente mais frequente no grupo FL/PNS comparado ao grupo controle, com um OR de 1,98 (95% IC: 1,29-3,01; $p=0,001$; Tabela 3). A distribuição dos genótipos para o polimorfismo rs560426 está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4).

Para o *lócus* polimórfico rs1530300, o alelo T foi o mais comum, sendo encontrado em 73,7% e 62,3% dos indivíduos dos grupos controle e FL/PNS, respectivamente (Tabela 2). O alelo C foi significativamente correlacionado com o grupo FL/PNS, indicando que o portador deste alelo apresenta um risco de 1,69 vezes maior de manifestar a FL/PNS que o indivíduo que carrega o alelo ancestral T ($p=0,000007$; OR: 1,69; 95% IC: 1,34-2,13; Tabela 2). Indivíduos com o genótipo TT foram mais frequentes em ambos os grupos, enquanto que indivíduos com o genótipo CC foram significativamente mais frequentes no grupo FL/PNS que no grupo controle ($p=0,000002$). O risco de um indivíduo CC ser afetado por FL/PNS foi de 3,27 vezes maior que um indivíduo TT (95% IC: 1,98-5,38; Tabela 3). A distribuição dos genótipos da amostra como um todo não respeitou o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,000002$; Tabela 4). Contudo, esta derivação foi conduzida pelas amostras do grupo FL/PNS ($p=0,000004$) e não pelas amostras do grupo controle ($p=0,47$), fortalecendo a associação deste polimorfismo genético com o desenvolvimento de FL/PNS.

Tabela 2. Distribuição alélica dos polimorfismos genéticos investigados nos grupos controle e FL/PNS.

Polimorfismo	Grupo Controle n (%)	Grupo FL/PNS n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
rs560426				
A	400 (59,2)	345 (50,1)	Referência	
G	276 (40,8)	343 (49,9)	1,44 (1,16-1,78)	0,0008
rs2013162				
C	460 (68,0)	467 (68,9)	Referência	
A	216 (32,0)	211 (31,1)	0,96 (0,76-1,21)	0,74
rs987525				
C	487 (72,0)	404 (59,1)	Referência	
A	189 (28,0)	280 (40,9)	1,78 (1,42-2,24)	0,0000001
rs1530300				
T	498 (73,7)	421 (62,3)	Referência	
C	178 (26,3)	255 (37,7)	1,69 (1,34-2,13)	0,000007
rs1443434				
T	435 (64,3)	459 (66,7)	Referência	
G	241 (35,7)	229 (33,3)	0,90 (0,72-1,12)	0,35
rs3758249				
G	431 (63,8)	464 (67,8)	Referência	
A	245 (36,2)	220 (32,2)	0,83 (0,66-1,04)	0,11
rs7078160				
G	546 (80,8)	547 (80,0)	Referência	
A	130 (19,2)	137 (20,0)	1,05 (0,80-1,37)	0,71
rs17085106				
G	653 (96,6)	652 (97,0)	Referência	
T	23 (3,4)	20 (3,0)	0,87 (0,47-1,60)	0,65
rs13041247				
T	435 (64,3)	478 (69,3)	Referência	
C	241 (35,7)	212 (30,7)	0,80 (0,64-1,00)	0,05

Tabela 3. Frequência genotípica dos polimorfismos investigados nos grupos controle e FL/PNS.

Polimorfismo	Grupo Controle n (%)	Grupo FL/PNS n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
rs560426				
AA	124 (36,7)	91 (26,5)	Referência	
AG	152 (45,0)	163 (47,3)	1,46 (1,03-2,07)	0,03
GG	62 (18,3)	90 (26,2)	1,98 (1,29-3,01)	0,001
rs2013162				
CC	157 (46,4)	167 (49,3)	Referência	
CA	146 (43,2)	133 (39,2)	0,85 (0,62-1,18)	0,34
AA	35 (10,4)	39 (11,5)	1,05 (0,63-1,73)	0,85
rs987525				
CC	181 (53,5)	120 (35,0)	Referência	
CA	125 (37)	164 (48,0)	1,98 (1,42-2,74)	0,00004
AA	32 (9,5)	58 (17,0)	2,73 (1,67-4,46)	0,00004
rs1530300				
TT	186 (55,0)	153 (45,3)	Referência	
TC	126 (37,3)	115 (34,0)	1,11 (0,79-1,54)	0,53
CC	26 (7,7)	70 (20,7)	3,27 (1,98-5,38)	0,000002
rs1443434				
TT	143 (42,3)	163 (47,4)	Referência	
GT	149 (44,1)	133 (38,6)	0,78 (0,56-1,08)	0,14
GG	46 (13,6)	48 (14,0)	0,91 (0,57-1,45)	0,71
rs3758249				
GG	142 (42,0)	163 (47,7)	Referência	
GT	147 (43,5)	138 (40,3)	0,82 (0,59-1,13)	0,22
AA	49 (14,5)	41 (12,0)	0,73 (0,45-1,17)	0,18
rs7078160				
GG	225 (66,6)	213 (62,3)	Referência	
GA	96 (28,4)	121 (35,4)	1,33 (0,96-1,84)	0,08
AA	17 (5,0)	8 (2,3)	0,49 (0,21-1,17)	0,10
rs17085106				
GG	316 (93,5)	317 (94,3)	Referência	
GT	21 (6,2)	18 (5,4)	0,85 (0,44-1,63)	0,63
TT	1 (0,3)	1 (0,3)	0,99 (0,06-16,01)	0,99
rs13041247				
TT	137 (40,5)	169 (49,3)	Referência	
TC	161 (47,7)	136 (39,6)	0,68 (0,49-0,94)	0,02
CC	40 (11,8)	38 (11,1)	0,77 (0,47-1,27)	0,30

Tabela 4. Cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os grupos controle e FL/PNS e para a amostra total.

Polimorfismo	Grupo Controle χ^2 / valor de p	Grupo FL/PNS χ^2 / valor de p	Total χ^2 / valor de p
rs560426	1,62 / 0,20	0,94 / 0,33	3,18 / 0,07
rs2013162	0,02 / 0,89	2,44 / 0,12	1,41 / 0,23
rs987525	2,3 / 0,13	0,002 / 0,89	2,4 / 0,12
rs1530300	0,52 / 0,47	25,72 / 0,000004	22,19 / 0,000002
rs1443434	0,52 / 0,47	5,76 / 0,02	4,88 / 0,03
rs3758249	1,94 / 0,16	1,17 / 0,28	3,21 / 0,07
rs7078160	2,48 / 0,11	3,73 / 0,053	0,09 / 0,33
rs17085106	1,01 / 0,31	1,76 / 0,18	2,69 / 0,10
rs13041247	0,49 / 0,48	1,76 / 0,18	0,21 / 0,65

5.3. Análise dos Haplótipos dos Polimorfismos rs987525 e rs1530300

Como os loci polimórficos rs987525 e rs1530300 estão localizados na região 8q24 a uma distância de aproximadamente 26 Kbp entre eles e ambos demonstraram conter alelos de suscetibilidade para FL/PNS, nós avaliamos a distribuição dos haplótipos destes 2 polimorfismos entre os grupos controle e FL/PNS. Como esperado, o haplótipo formado pelos alelos C-T (alelo C do polimorfismo rs987525 e alelo T do polimorfismo rs1530300) foi o mais frequente na população analisada (Tabela 5), revelando um desequilíbrio de ligação de $r^2=0,79$ e $D'=0,94$. Interessantemente, os 2 alelos de risco (A do polimorfismo rs987525 e C do polimorfismo rs1530300) segregaram como um haplótipo em uma frequência significativamente maior no grupo FL/PNS comparado com o grupo controle ($p=0,0002$; Tabela 5). Indivíduos com o haplótipo A-C apresentaram um risco de 1,75 vezes maior de apresentar FL/PNS que um indivíduo contendo o haplótipo C-T (OR: 1,75; 95% IC: 1,29-2,35; Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos haplótipos dos polimorfismos rs987525 e rs1530300 localizados na região 8q24.

Haplótipo*	Grupo Controle	Grupo FL/PNS	OR (95% IC)	Valor de p
C-T	43,9%	35,1%	Referência	
A-T	20,1%	22%	1,37 (1,03-1,83)	0,03
C-C	19,5%	19,6%	1,26 (0,94-1,70)	0,12
A-C	16,5%	23,3%	1,75 (1,29-2,35)	0,0002

*Sequência dos polimorfismos: rs987525 e rs1530300.

5.4. Distribuição dos Polimorfismos Genéticos em Relação ao Tipo de Fissura

Os polimorfismos rs987525, rs560426 e rs1530300 correlacionaram significativamente com a frequência de FL (Tabela 6). O alelo A do polimorfismo rs987525 foi significativamente mais frequente no grupo FL comparado com o grupo controle ($p=0,0004$), indicando um OR de 1,89 (95% IC: 1,32-2,71). Em relação ao polimorfismo rs560426, o alelo de risco G foi significativamente

correlacionado com FL com um OR de 1,73 ($p=0,002$; 95% IC: 1,22-2,45). O alelo C do polimorfismo rs1530300 também foi significativamente correlacionado com o grupo FL ($p=0,001$; OR: 1,83; 95% IC: 1,27-2,64).

Os polimorfismos rs987525, rs560426 e rs1530300 também foram significativamente correlacionados com FLP (Tabela 7). O alelo A do polimorfismo rs987525 foi significativamente mais frequente no grupo FLP comparado ao controle ($p=0,000001$) e a sua presença demonstrou ser um fator de risco para FL/PNS com um OR de 1,92 (95% IC: 1,48-2,50). O alelo G do polimorfismo rs560426 foi encontrado em uma frequência significativamente maior no grupo FLP que no grupo controle ($p=0,003$), gerando um OR de 1,46 (IC 95%: 1,13-1,88). Para o polimorfismo rs1530300, o alelo C foi significativamente correlacionado com o grupo FLP ($p=0,00002$), revelando que um indivíduo com este alelo apresenta um risco de 1,78 vezes maior de apresentar uma FLP comparado ao indivíduo que carrega o alelo T (95% IC: 1,36-2,32).

Nenhuma correlação significativa entre os polimorfismos deste estudo e a FP foi observada (Tabela 8).

Tabela 6. Frequência alélica dos polimorfismos investigados nos grupos controle e FL.

Polimorfismo	Grupo Controle n (%)	Grupo FL n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
rs560426				
A	400 (59,2)	72 (45,6)	Referencia	0,002
G	276 (40,8)	86 (54,4)	1,73 (1,22-2,45)	
rs2013162				
C	460 (68)	109 (70,8)	Referencia	0,51
A	216 (32)	45 (29,2)	0,88 (0,60-1,29)	
rs987525				
C	487 (72)	91 (57,6)	Referencia	0,0004
A	189 (28)	67 (42,4)	1,89 (1,32-2,71)	
rs1530300				
T	498 (73,7)	93 (60,4)	Referencia	0,001
C	178 (26,3)	61 (39,6)	1,83 (1,27-2,64)	
rs1443434				
T	435 (64,3)	97 (61,4)	Referencia	0,48
G	241 (35,7)	61 (38,6)	1,13 (0,79-1,62)	
rs3758249				
G	431 (63,8)	97 (62,2)	Referencia	0,71
A	245 (36,2)	59 (37,8)	1,07 (0,74-1,53)	
rs7078160				
G	546 (80,8)	129 (81,6)	Referencia	0,80
A	130 (19,2)	29 (18,4)	0,94 (0,60-1,47)	
rs17085106				
G	653 (96,6)	146 (96,1)	Referencia	0,74
T	23 (3,4)	6 (3,9)	1,16 (0,46-2,91)	
rs13041247				
T	435 (64,3)	110 (70,5)	Referencia	0,14
C	241 (35,7)	46 (29,5)	0,75 (0,51-1,10)	

Tabela 7. Frequência alélica dos polimorfismos investigados nos grupos controle e FLP.

Polimorfismo	Grupo Controle n (%)	Grupo FLP n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
rs560426				
A	400 (59,2)	195 (49,7)	Referencia	0,003
G	276 (40,8)	197 (50,3)	1,46 (1,13-1,88)	
rs2013162				
C	460 (68)	264 (68,4)	Referencia	0,91
A	216 (32)	122 (31,6)	0,98 (0,75-1,28)	
rs987525				
C	487 (72)	222 (57,2)	Referencia	0,000001
A	189 (28)	166 (42,8)	1,92 (1,48-2,50)	
rs1530300				
T	498 (73,7)	237 (61,1)	Referencia	0,00002
C	178 (26,3)	151 (38,9)	1,78 (1,36-2,32)	
rs1443434				
T	435 (64,3)	266 (67,9)	Referencia	0,24
G	241 (35,7)	126 (32,1)	0,85 (0,65-1,11)	
rs3758249				
G	431 (63,8)	271 (69,1)	Referencia	0,07
A	245 (36,2)	121 (30,9)	0,78 (0,60-1,02)	
rs7078160				
G	546 (80,8)	309 (79,6)	Referencia	0,65
A	130 (19,2)	79 (20,4)	1,07 (0,78-1,46)	
rs17085106				
G	653 (96,6)	374 (97,4)	Referencia	0,47
T	23 (3,4)	10 (2,6)	0,76 (0,35-1,61)	
rs13041247				
T	435 (64,3)	269 (68,6)	Referencia	0,15
C	241 (35,7)	123 (31,4)	0,82 (0,63-1,07)	

Tabela 8. Frequência alélica dos polimorfismos investigados nos grupos controle e FP.

Polimorfismo	Grupo Controle n (%)	Grupo FP n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
rs560426				
A	400 (59,2)	78 (56,5)	Referência	
G	276 (40,8)	60 (43,5)	1,11 (0,77-1,61)	0,56
rs2013162				
C	460 (68)	94 (68,1)	Referência	
A	216 (32)	44 (31,9)	0,99 (0,67-1,47)	0,98
rs987525				
C	487 (72)	91 (65,9)	Referência	
A	189 (28)	47 (34,1)	1,33 (0,90-1,96)	0,15
rs1530300				
T	498 (73,7)	91 (67,9)	Referência	
C	178 (26,3)	43 (32,1)	1,32 (0,88-1,97)	0,17
rs1443434				
T	435 (64,3)	96 (69,6)	Referência	
G	241 (35,7)	42 (30,4)	0,79 (0,53-1,17)	0,24
rs3758249				
G	431 (63,8)	96 (70,6)	Referência	
A	245 (36,2)	40 (29,4)	0,73 (0,49-1,09)	0,13
rs7078160				
G	546 (80,8)	109 (79)	Referência	
A	130 (19,2)	29 (21)	1,11 (0,71-1,75)	0,63
rs17085106				
G	653 (96,6)	132 (97,1)	Referência	
T	23 (3,4)	4 (2,9)	0,86 (0,29-2,53)	0,78
rs13041247				
T	435 (64,3)	95 (68,8)	Referência	
C	241 (35,7)	43 (31,2)	0,81 (0,55-1,21)	0,31

5.5. Análise Estruturada pela Ancestralidade dos Polimorfismos Genéticos

Com um filtro de 80% (isto é, incluímos amostras onde foi possível analisar pelo menos 32 marcadores), nós consideramos satisfatória a caracterização da ancestralidade de 235 indivíduos do grupo controle e 223 pacientes com FL/PNS. Em ambos os grupos, a principal contribuição foi a de origem Européia. Na média, o grupo controle foi composto por 72,8% de ancestralidade Européia, 20,4% por ancestralidade Africana e 6,8% de ancestralidade Ameríndia (Tabela 8). O grupo FL/PNS demonstrou 68,8% de ancestralidade Européia, 25,4% de Africana e 5,8% de Ameríndia. Não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 8). Figura 1 demonstra a proporção de ancestralidade de cada indivíduo do estudo, bem como dos indivíduos de ancestralidade conhecida.

Assumindo a estratificação populacional, os polimorfismos rs987525, rs560426 e rs1530300 continuaram a demonstrar uma correlação significativa com o risco de ocorrência de FL/PNS (Tabela 9). O alelo A foi significativamente mais frequente no grupo FL/PNS, resultando em um risco de 1,63 vezes maior de FL/PNS comparado ao grupo controle ($p=0,009$; OR: 1,63; 95% IC: 1,24-2,15). O alelo G do polimorfismo rs560426 foi encontrado em uma frequência significativamente maior no grupo FL/PNS (50%) quando comparado com o grupo controle (38,5%) (Tabela 9). Então, a presença do alelo G demonstrou um significativo efeito de risco para a FL/PNS ($p=0,000001$; OR: 1,6; IC 95%: 1,22-2,07). Após a estruturação populacional, o alelo C do polimorfismo rs1530300 demonstrou ser um significativo fator de risco para FL/PNS, com um OR de 1,16 ($p=0,000001$; 95% IC: 1,33-2,35; Tabela 9).

Tabela 8. Ancestralidade das amostras deste estudo.

Ancestralidade	Grupo Controle (%)	Grupo FL/PNS (%)	Valor de p
Ameríndia	6,8	5,8	0,42
Africana	20,4	25,4	
Européia	72,8	68,8	

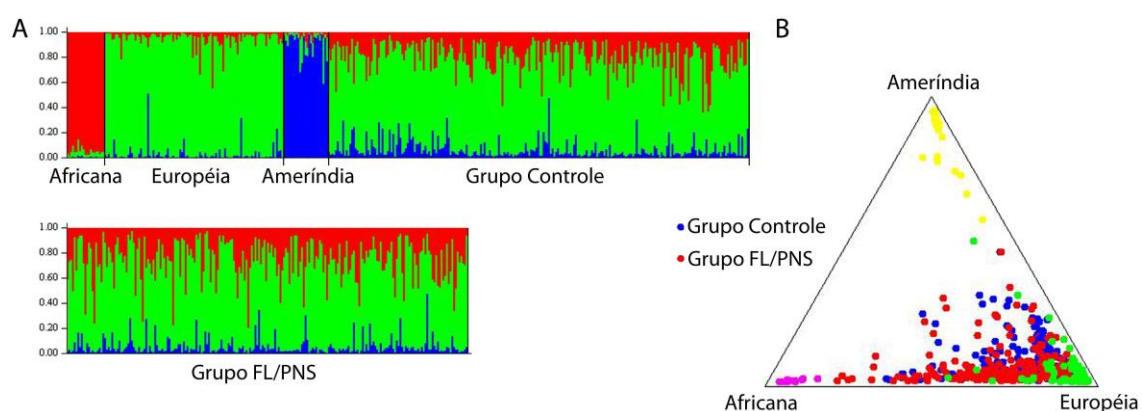


Figura 1. Representação da ancestralidade dos indivíduos dos grupos controle e FL/PNS. **(A)** Cada coluna representa um indivíduo e os cálculos pelo Programa Structure foram baseados em 3 populações (K=3). A porção em vermelho corresponde à ancestralidade Africana, em verde a ancestralidade Européia e em azul a ancestralidade Ameríndia. **(B)** Distribuição dos indivíduos dos grupos controle e FL/PNS em relação à porcentagem de ancestralidade. Cada ponto representa um indivíduo e os vértices correspondem aos indivíduos com ancestralidade conhecidas (rosa – Africana, amarelo – Ameríndio e verde – Européia).

Tabela 9. Comparação da frequência alélica dos polimorfismos deste estudo para os grupos controle e FL/PNS corrigido pela ancestralidade.

Polimorfismo	Grupo Controle n (%)	Grupo FL/PNS n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
rs560426				
A	289 (61,5)	223 (50)	Referencia	0,000001
G	181 (38,5)	223 (50)	1,6 (1,22-2,07)	
rs2013162				
C	316 (67,2)	303 (67,9)	Referencia	0,10
A	154 (32,8)	143 (32,1)	0,96 (00,73-1,27)	
rs987525				
C	336 (71,5)	270 (60,5)	Referencia	0,009
A	134 (28,5)	176 (34,5)	1,63 (1,24-2,15)	
rs1530300				
T	352 (74,9)	280 (62,8)	Referencia	0,000001
C	118 (25,1)	166 (37,2)	1,76 (1,33-2,35)	
rs1443434				
T	304 (64,7)	307 (68,8)	Referencia	0,22
G	166 (35,3)	139 (31,2)	0,83 (0,63-1,10)	
rs3758249				
G	299 (63,6)	312 (69,9)	Referencia	0,07
A	171 (36,4)	134 (30,1)	0,75 (0,57-0,99)	
rs7078160				
G	384 (81,7)	351 (78,7)	Referencia	0,36
A	86 (18,3)	95 (21,3)	1,2 (0,87-1,67)	
rs17085106				
G	453 (96,4)	432 (96,9)	Referencia	0,23
T	17 (3,6)	14 (3,1)	0,86 (0,42-1,77)	
rs13041247				
T	306 (65,1)	311 (69,7)	Referencia	0,42
C	164 (34,9)	135 (30,3)	0,81 (0,61-1,07)	

6. DISCUSSÃO

Embora muitos genes e regiões cromossômicas associadas à FL/PNS são conhecidos atualmente, ainda estamos longe de uma completa compreensão da etiologia desta alteração multifatorial. As FL/PNS são geneticamente complexas, resultado da diversidade gênica, baixa penetrância e influência de vários fatores ambientais são geneticamente complexas (revisado por Lidral *et al.*, 2008). Em adição, a distribuição dos polimorfismos e haplótipos e suas correlações com as FL/PNS variam amplamente entre os diferentes estudos, sugerindo que a heterogeneidade étnica das populações mundiais dificulta o completo entendimento da etiopatogenia das FL/PNS. Portanto, estudos de validação de *loci* de susceptibilidade são essenciais para definir os alelos de risco específicos para cada população, aumentando a nossa compreensão sobre este distúrbio complexo. Este fato é particularmente importante em populações miscigenadas, tais como as do Brasil. Como a proporção das ancestralidades Ameríndia, Africana e Européia variam em cada indivíduo brasileiro, a contribuição de polimorfismos específicos identificados em estudos de associação de larga escala na etiologia da FL/PNS pode não ser válida nos brasileiros. O presente estudo avaliou 9 regiões polimórficas descritas como de suscetibilidade ao desenvolvimento das FL/PNS e revelou que 3 polimorfismos, rs560426 em 1p22.1 e rs987525 e rs1530300 em 8q24, são marcadores de risco para FL/PNS na população brasileira.

A associação do polimorfismo rs560426 com FL/PNS foi originalmente destacada no GWAS de Beaty e colaboradores (2010) que usou a abordagem de análise de desequilíbrio de transmissão (transmission disequilibrium test, TDT). Embora uma significativa associação foi encontrada com pacientes de origens asiática e européia, as tentativas de replicar este resultado em populações asiáticas (Pan *et al.*, 2011), da Europa Central (Mangold *et al.*, 2009), Polônia (Mostowska *et al.*, 2012) e África (Weatherley-White *et al.*, 2011) não obtiveram sucessos. Em nosso estudo, portadores do alelo G para o polimorfismo rs560426 exibiram um risco 1,6 vezes maior de FL/PNS em comparação com os portadores do alelo A. Este achado é

semelhante aos resultados (OR 1,432; IC 95% 1,292-1,587) dos estudos de Beaty *et al.* (2010).

O polimorfismo rs560426 está contido no gene *ABCA4*, que codifica uma proteína transmembrânica. Análises da sequência de todos os 50 exons deste gene em pacientes fissurados de Iowa e Filipinas identificaram 26 variantes de sentido trocado (*missense*), contudo esta análise foi limitada porque as frequências não foram avaliadas em grandes amostras de caso-controle (Mangold *et al.*, 2011). Em adição, a análise por hibridação *in situ* revelou que *ABCA4* não é expresso nas estruturas palatinas de embriões de camundongos com idade embrionária de 13,5-14,5 dias, período relevante para palatogênese murina. No entanto, *ABCA4* pode não ser expressa no período de tempo analisado (Beaty *et al.*, 2010). Frente a estes resultados, foi sugerido que outro gene pode ser responsável pela associação observada (Dixon *et al.*, 2011). O gene que codifica *PTPL1* associada à Rho-GTPase (*PARG1*) é um forte gene candidato neste *locus* porque ele está localizado em uma posição diretamente adjacente ao *ABCA4* e tem mostrado diferentes níveis de expressão após interação com ácido fólico (Katula *et al.*, 2007). Considerando todos os resultados com o polimorfismo rs560426, outros estudos devem ser realizados para confirmar se a associação com FL/PNS é direta ou dependente de algum outro polimorfismo em desequilíbrio de ligação.

O *locus* gênico 8q24 tem demonstrado papel importante em vários estudos relacionados à FL/PNS em diferentes populações. O estudo de Mangold e colaboradores (2010) demonstrou que uma região abrangendo 640 Kb neste *locus* cromossômico contém possivelmente múltiplos marcadores associados à FL/PNS, contudo, como em GWAS os pesquisadores têm que determinar um *threshold* alto para separar de forma confiável os marcadores verdadeiros de falso-positivos, apenas o marcador rs987525 se sobressaiu. A associação entre rs987525 e FL/PNS desde então tem sido replicada em estudos adicionais em pacientes de várias etnias (Mostowska *et al.*, 2010; Blanton *et al.*, 2010; Nikopensius *et al.*, 2009; Rojas-Martinez *et al.*, 2010). O alelo de risco demonstrou um efeito variando de 1,4 a 11,1, com uma média de 2 vezes para a amostra européia (Beaty *et al.*, 2010). As frequências alélicas

para rs987525 variam fortemente entre as populações, com um MAF (*Minor Allele Frequency*) de menos de 10% tendo sido relatados em asiáticos e cerca de 15 a 25% em europeus (Birnbaum *et al.*, 2009). Há também alguma evidência de que a força da associação pode variar entre as populações (Beaty *et al.*, 2010; Nikopensius *et al.*, 2009; Rojas-Martinez *et al.*, 2010). No entanto, os intervalos de confiança dos *odds ratios* (OR) são geralmente grandes, e é muito cedo para tirar qualquer conclusão definitiva. No estudo realizado pelo grupo de Baltimore, a maior investigação de uma população não-européia até a data, a proporção de alelos transmitidos contra os não-transmitidos foi semelhante para asiáticos e europeus, indicando que o efeito do *locus* gênico 8q24 é igualmente forte em ambas as populações (Mangold *et al.*, 2011). Entretanto alguns estudos em populações asiáticas não tem encontrado associação de 8q24 à FL/PNS (Xu *et al.*, 2011; Hikida *et al.*, 2011).

Em europeus, o risco atribuível à população (PAR) para rs987525 foi estimado em 0,41 (Birnbaum *et al.*, 2009), sugerindo que o *locus* 8q24 é um *locus* de grande susceptibilidade para FL/PNS. Isso também explica por que este *locus* foi detectado em um estudo GWAS com uma amostra relativamente pequena. O PAR para a população asiática ainda não foi calculado. No entanto, a baixa frequência do alelo de risco sugere que será consideravelmente menor em comparação com o relatado em europeus. Notavelmente, como a taxa de prevalência de FL/PNS é muito maior em asiáticos comparados com os europeus (Murray, 2002), a associação entre 8q24 e FL/PNS suporta a hipótese de que *loci* adicionais de susceptibilidade existem, e que estes podem ser mais frequentes em populações de países asiáticos. Interessantemente, o GWAS de Grant e colaboradores (2009) revelou ainda a associação de rs1530300 à FL/PNS, que estava em desequilíbrio de ligação com rs987525 e mostrou uma associação ainda mais forte à susceptibilidade de FL/PNS em trios irlandeses. Os resultados do presente estudo confirmou a associação significativa de rs1530300 como marcador único e como haplótipo com rs987525. Como marcador único, a associação de rs1530300 com FL/PNS foi mais forte em comparação ao rs987525. Blanton *et al.* (2010) também demonstraram que a região 8q24

contém um *locus* de susceptibilidade para FL/PNS, como revelado pela associação positiva dos alelos de risco contidas em rs1530300 e rs987525. Embora o envolvimento do *locus* 8q24 na patogênese da FL/PNS esteja acima de dúvidas, o mecanismo pelo qual este polimorfismo exerce seu efeito permanece desconhecido. Uma região de 640 kbp em 8q24 não contém genes conhecidos até o momento (<http://genome.ucsc.edu>), sugerindo que este polimorfismo está contido em uma região de regulação gênica.

Os polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 obtiveram correlação significativa somente com FL e FLP. Apesar de ainda existirem dúvidas quanto à separação da FLP e FL em duas entidades distintas ou não, nossos resultados corroboram com as evidências embriológicas que demonstram que FLP e FL são variantes do mesmo defeito, diferindo apenas no grau de severidade (Mitchell *et al.*, 2002; Fogh-Andersen, 1946). Por outro lado, a FP está bem estabelecida como uma entidade separada dos defeitos da fissura labial com base em evidências epidemiológicas e embriológicas (Mossey & Little, 2002; Marazita, 2002a).

Como um resultado não esperado deste estudo, nós observamos que a ancestralidade genômica não demonstrou influência alguma na susceptibilidade dos polimorfismos como marcadores de risco para o desenvolvimento das FL/PNS. Uma das críticas comuns dos estudos na área de polimorfismos genéticos em estudos caso-controle é a formação dos grupos quando a sua composição étnica. Portanto, desde o início nós sempre estivemos preocupados com a seleção das amostras, procurando selecionar voluntários de uma mesma região geográfica. Esta preocupação foi importante, pois não houve diferenças significantes nas proporções ancestrais entres os grupos estudados, sendo a ancestralidade européia a mais predominante em ambos os grupos. Em um estudo recente, Pena e colaboradores (2011) demonstraram que independente da região brasileira, a ascendência européia foi a mais predominante, com proporções que variam de 60,6% a 77,7%. Foi proposto que a imigração de 6 milhões de europeus para o Brasil nos séculos 19 e 20 - um fenômeno descrito como o "branqueamento do Brasil" - foi em

grande parte responsável pela dissipação das diferenças ancestrais que refletiam a história da população de cada região brasileira.

Não houve associação significativa entre os outros 6 polimorfismos avaliados na população brasileira examinada, demonstrando que sua presença pode não desempenhar um papel importante na etiologia da FL/PNS nesta população. A relevância de nossos achados podem extrapolar as fronteiras do Brasil, porque as populações miscigenadas são encontradas em muitos outros países da América Latina.

Os resultados deste estudo apresentam certas limitações. Embora seja bem estabelecido que as FL/PNS refletem a ação de fatores genéticos e ambientais, este estudo se limitou a analisar a parte genética, deixando de lado os fatores ambientais coexistentes. O tamanho da amostra também é outro possível fator limitador dos nossos resultados, uma vez que efeitos pequenos podem ter sido perdidos, particularmente no grupo FP. Contudo, é interessante notar que o poder estatístico para os 6 polimorfismos que não demonstraram associação variou de 55,2% a 86,7%. Em adição, a abordagem caso-controle com grupos grandes é pouco rigorosa e, talvez fosse necessário realizar uma análise do tipo TDT (teste de desequilíbrio de transmissão). O TDT tem recebido atenção particular, pois se baseia tanto em informação de ligação como no desequilíbrio, que são subjacentes à associação. Neste tipo de análise são selecionadas amostras de pessoas com uma determinada característica (casos) e estuda-se o marcador neles e em seus progenitores. Para o teste ser informativo, pelo menos um dos progenitores tem que ser heterozigoto para o *locus* marcador (Feitosa & Krieger, 2002).

Em resumo, nossos resultados demonstram pela primeira vez o envolvimento de rs560426 em 1p22.1 e de 8q24 por meio dos polimorfismos rs1530300 e rs987525 na patogênese da FL/PNS na população brasileira. Nossos resultados devem incentivar a aplicação de uma abordagem semelhante em pacientes de outros países que abrigam populações miscigenadas, para aumentar a nossa compreensão e conhecimento dos eventos genéticos que contribuem para esta doença complexa.

7. CONCLUSÕES

1. Nossos resultados demonstraram que os polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 foram significativamente associados a um risco aumentado para o desenvolvimento de FL/PNS, independente da correção para a estrutura ancestral genômica de cada indivíduo.

2. Os polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 foram associados às FL e FLP, mas não com as FP.

3. Os polimorfismos rs2013162 em 1q32, rs1443434 e rs3758249 em 9q21, rs7078160 em 10q25.3, rs17085106 em 18q22 e rs13041247 em 20q12 não apresentaram nenhuma associação significativa com FL/PNS na população brasileira.

REFERÊNCIAS

- Antony AC. In utero physiology: role of folic acid in nutrient delivery and fetal development. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(2): 598S-603S.
- 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.
- Azarian SM, Travis GH. The photoreceptor rim protein is an ABC transporter encoded by the gene for recessive Stargardt's disease (ABCR). *FEBS Lett.* 1997; 409:247–252.
- Badovinac RL, Werler MM, Williams PL, Kelsey KT, Hayes C. Folic acid containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007; 79(1): 8-15.
- Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet.* 2006 Sep; 70(Pt 5):658-65.
- Beaty TH, Maestri NE, Hetmanski JB, Wyszynski DF, Vanderkolk CA, Simpson JC. Testing for interaction between maternal smoking and TGFA genotype among oral cleft cases born in Maryland 1992-1996. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997; 34(5): 447-54.
- Beaty TH, Murray JC, Marazita M. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet.* 2010; 42: 525-9.
- Berk NW, Marazita ML. The costs of cleft lip and palate: personal and societal implications. In: Wyszynski DF, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment.* New York: Oxford University Press, 2002: 458-67.
- Bertuzzi S., Hindges, R., Mui, S.H., O'Leary, D.D.M., and Lemke, G. The homeodomain protein Vax1 is required for axon guidance and major tract formation in the developing forebrain. *Genes & Dev.* 1999; 13: 3092–3105.

- Bhongsatiern J, Ohtsuki S, Tachikawa M, Hori S, Terasaki T. Retinal-specific ATP-binding cassette transporter (ABCR/ABCA4) is expressed at the choroid plexus in rat brain. *J Neurochem.* 2005; 92:1277–1280.
- Bille C, Olsen J, Vach W, Knudsen VK, Olsen SF, Rasmussen K. Oral clefts and life style factors – a case-cohort study based on prospective Danish data. *Eur J Epidemiol.* 2007; 22(3): 173-81.
- Birnbaum S, Reutter H, Lauster C, Scheer M, Schmidt G, Saffar M, Martini M, Hemprich A, Henschke H, Kramer FJ, Mangold E. Mutation screening in the IRF6-gene in patients with apparently nonsyndromic orofacial clefts and a positive family history suggestive of autosomal-dominant inheritance. *Am J Med Genet A.* 2008 Mar 15; 146A (6):787-90.
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, et al. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2009; 41: 473-7.
- Blanco-Davila F. Incidence of cleft lip and palate in the northeast of Mexico: a 10-year study. *J Craniofac Surg.* 2003; 14(4): 533-7.
- Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A.* 2005; 137A (3): 259-62.
- Blanton S.H., Burt A., Stal S., Mulliken J.B., Garcia E., Hecht J.T. Family-based study shows heterogeneity of a susceptibility locus on chromosome 8q24 for nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology.* 2010, 88 (4), pp. 256-259.
- Blik BJ, van Schaik RH, van der Heiden IP, Sayed-Tabatabaei FA, van Duijn CM, Steegers EA. 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): 2088-92.
- Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(9): 724-31.

- Boyles AL, Billups AV, Deak KL, Siegel DG, Mehltrittter L, Slifer SH, et al. Neural tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions. *Environ Health Perspect.* 2006; 114(10): 1547-52.
- 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- 9.
- 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): 247-55.
- Brandalize AP, Bandinelli E, Borba JB, Felix TM, Roisenberg I, Schuler-Faccini L. Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(6): 787-91.
- Briggs RM. Vitamin supplementation as a possible factor in the incidence of cleft lip/palate deformities in humans. *Clin Plast Surg.* 1976; 3(4): 647-52.
- Brockton NT. Localized depletion: the key to colorectal cancer risk mediated by MTHFR genotype and folate? *Cancer Causes Control.* 2006; 17: 1005-16.
- 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 Mar; 35(2): 127-31.
- Bufalino A, Ribeiro Paranaíba LM, Nascimento de Aquino S, Martelli-Júnior H, Oliveira Swerts MS, Coletta RD. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010 Nov; 88(11):980-6.
- Butali A, Mossey PA, Adeyemo WL, Jezewski PA, Onwuamah CK, Ogunlewe MO, Ugboko VI, Adejuyigbe O, Adigun AI, Abdur-Rahman LO,

- Onah II, Audu RA, Idigbe EO, Mansilla MA, Dragan EA, Petrin AL, Bullard SA, Uduezue AO, Akpata O, Osaguona AO, Olasoji HO, Ligali TO, Kejeh BM, Iseh KR, Olaitan PB, Adebola AR, Efunkoya E, Adesina OA, Oluwatosin OM, Murray JC. Genetic studies in the nigerian population implicate an MSX1 mutation in complex oral facial clefting disorders. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011 Nov; 48(6):646-53.
- Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. *Am J Hum Biol*. 2003; 15:824–34.
 - Calzolari E, Milan M, Cavazzuti GB, Cocchi G, Gandini E, Mangnani C. Epidemiological and genetic study of 200 cases of oral cleft in Emilia Romagna Region of Northern Italy. *Teratology*. 1988; 38(6): 559-64.
 - Canfield MA, Collins JS, Botto LD, Williams LJ, Mai CT, Kirby RS. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2005; 73(10): 679-89.
 - 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 Oct; 71(10):1509-19.
 - Carlson LC, Hatcher KW, Vander Burg R. Elevated Infant Mortality Rates among Oral Cleft and Isolated Oral Cleft Cases: A Meta-analysis of Studies from 1943-2010. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011 Oct 24.
 - Carmichael SL, Shaw GM, Ma C, Werler MM, Rasmussen SA, Lammer EJ. Maternal corticosteroid use and orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol*. 2007; 197(6): 585.e1-7.
 - Carroll N, Pangilinan F, Molloy AM, Troendle J, Mills JL, Kirke PN. Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. *Hum Genet*. 2009; 125(3): 247-56.
 - Carter TC, Molloy AM, Pangilinan F, Troendle JF, Kirke PN, Conley MR, Orr DJ, Earley M, McKiernan E, Lynn EC, Doyle A, Scott JM, Brody LC,

- Mills JL. Testing reported associations of genetic risk factors for oral clefts in a large Irish study population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010 Feb; 88(2):84-93.
- Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Leger J, Lyonnet S, Pelet A, Czernichow P, Chatterjee K, Polak M. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet* 2002; 11:2051–2059.
 - Cedergren M, Källén B. Maternal obesity and the risk for orofacial clefts in the offspring. *Cleft Palate Craniofac J.* 2005; 42(4): 367-71.
 - Chevrier C, Perret C, Bahuaud 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): 114-22.
 - Chevrier C, Bahuaud M, Perret C, Iovannisci DM, Nelva A, Herman C. 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): 2396-406.
 - Chevrier C, Bahuaud M, Perret C, Iovannisci DM, Nelva A, Herman C. 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): 2396-406.
 - 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 Jul;39(4):392-6.
 - Christensen K, Juel K, Herskind AM, Murray JC. Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. *BMJ.* 2004; Jun 12; 328(7453):1405.
 - Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarová MM. Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. *Am J Med Genet.* 1998 Aug 27; 79(1):42-7.

- Curtis EJ, Fraser FC, Warburton D. Congenital cleft lip and palate. *Am J Dis Child*. 1961; 102: 853-57.
- Czeizel AE. Controlled studies of multivitamin supplementation on pregnancy outcomes. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 15(678): 266-75.
- Dathan N, Parlato R, Rosica A, De Felice M, Di Lauro R. Distribution of *tcf2/foxe1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate, and hair. *Dev Dyn*. 2002; 224:450–456.
- 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): 638-46.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011; 12:167-178.
- Dostal A, Nemeckova J, Gaillyova R. The 18q deletion syndrome and analysis of the critical region for orofacial cleft at 18q22.3. *J Craniomaxillofac Surg*. 2009 Jul;37(5):272-5.
- Dravet C, Julian C, Legras C, Magaouda A, Guerrini R, Genton P. Epilepsy, antiepileptic drugs, and malformations in children of women with epilepsy: a French prospective cohort study. *Neurology*. 1992; 42(4 Suppl 5): 75-82.
- Feitosa Mary F., Krieger Henrique. O futuro da epidemiologia genética de características complexas. *Ciênc. saúde coletiva*. 2002; 7(1): 73-83.
- Field LL, Ray AK, Cooper ME, Goldstein T, Shaw DF, Marazita ML. Genome Scan for Loci involved in Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Families From West Bengal, India. *Am J Med Genet A*. 2004; 130A (3): 265-71.
- Fogh-Andersen P. Harelip and cleft palate; 1,000 patients submitted to operation. *Acta Chir Scand*. 1946 Jul 6; 94(3/4):213-42.
- Fraser FC. The genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Hum Genet*. 1970 May; 22(3):336-52.

- 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): 128-33.
- Froster-Iskenius UG. Popliteal pterygium syndrome. *J Med Genet.* 1990; 27(5): 320-6.
- Garcia AM. Occupational exposure to pesticides and congenital malformations: a review of mechanisms, methods, and results. *Am J Ind Med.* 1998; 33(3): 232-40.
- Gaspar DA, Pavanello RC, Zatz M. Role of the C677T polymorphism at the MTHFR gene on risk to nonsyndromic cleft lip with/without cleft palate: results from a case-control study in Brazil. *Am J Med Genet.* 1999; 87: 197-9.
- Ghassibe M, Bayet B, Revencu N, Verellen-Dumoulin C, Gillerot Y, Vanwijck R. 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): 1239-42.
- Ghoussaini M, Song H, Koessler T, Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Driver KE, Pooley KA, Ramus SJ, Kjaer SK, Hogdall E, DiCioccio RA, Whittemore AS, Gayther SA, Giles GG, Guy M, Edwards SM, Morrison J, Donovan JL, Hamdy FC, Dearnaley DP, Ardern-Jones AT, Hall AL, O'Brien LT, Gehr-Swain BN, Wilkinson RA, Brown PM, Hopper JL, Neal DE, Pharoah PD, Ponder BA, Eeles RA, Easton DF, Dunning AM. Multiple loci with different cancer specificities within the 8q24 gene desert. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Jul 2;100(13):962-6
- Gladstone J, Nulman I, Koren G. Reproductive risks of binge drinking during pregnancy. *Reprod Toxicol.* 1996; 10(1): 3-13.
- 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): 123-9.
- 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, 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: 909-13.
- Grosen D, Bille C, Petersen I, Skytthe A, Hjelmborg JB, Pedersen JK, Murray JC, Christensen K. Risk of oral clefts in twins. *Epidemiology*. 2011 May; 22(3):313-9.
- Hallonet M, Hollemann T, Pieler T, Gruss P. Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system. *Genes Dev*. 1999 Dec 1; 13(23):3106-14.
- Hang Y, Stein R. MafA and MafB activity in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2011 Sep;22(9):364-73.
- 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): 1608-14.
- Hikida M, Tsuda M, Watanabe A, Kinoshita A, Akita S, Hirano A, Uchiyama T, Yoshiura KI. No evidence of association between 8q24 and susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without palate in Japanese population. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011 Oct 7.
- Holmes LB, Baldwin EJ, Smith CR, Habecker E, Glassman L, Wong SL. Increased frequency of isolated cleft palate in infants exposed to lamotrigine during pregnancy. *Neurology*. 2008; 27; 70(2): 2152-8.
- Honein MA, Rasmussen SA, Reefhuis J, Romitti PA, Lammer EJ, Sun L. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology*. 2007; 18(2): 226-33.
- Huang Y, Wu J, Ma J, Beaty TH, Sull JW, Zhu L, Lu D, Wang Y, Meng T, Shi B. Association between IRF6 SNPs and oral clefts in West China. *J Dent Res*. 2009 Aug; 88(8):715-8.
- Huang E, Cheng H, Xu M, Shu S, Tang S. Association between single-nucleotide polymorphisms on chromosome 1p22 and 20q12 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: New data in Han Chinese and meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012 Apr 21

- Hwang SJ, Beaty TH, Panny SR, Street NA, Joseph JM, Gordon S. Association study of transforming growth factor alpha (TGF alpha) TaqI polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects. *Am J Epidemiol.* 1995; 141(7): 629-36.
- Jakobsen LP, Bugge M, Ullmann R, Schjerling CK, Borup R, Hansen L, Eiberg H, Tommerup N. 500K SNP array analyses in blood and saliva showed no differences in a pair of monozygotic twins discordant for cleft lip. *Am J Med Genet A.* 2011 Mar; 155A (3):652-5.
- Jamilian A, Nayeri F, Babayan A. Incidence of cleft lip and palate in Tehran. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2007; 25(4): 174-6.
- Jehee FS, Burin BA, Rocha KM, Zechi-Ceide R, Bueno DF, Brito L. Novel mutations in IRF6 in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: when should IRF6 mutational screening be done? *Am J Med Genet A.* 2009; 149A (6): 1319-22.
- 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): 249-57.
- 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): 50-6.
- Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol.* 2008; 37(5): 1041-58.
- Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15(3): 270-78.
- 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): 413-24.

- Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis.* 2009 Oct;15(7):437-53
- Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, Christensen K, Boyles AL, Daack-Hirsch S, Nguyen TT, Christiansen L, Lidral AC, Murray JC. Fetal genetic risk of isolated cleft lip only versus isolated cleft lip and palate: a subphenotype analysis using two population-based studies of orofacial clefts in Scandinavia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011 Feb; 91(2):85-92.
- Kanaan ZM, Mahfouz R, TaOMIM H. The prevalence of consanguineous marriages in an underserved area in Lebanon and its association with congenital anomalies. *Genet Test.* 2008; 12(3): 367-72.
- Katula KS, Heinloth AN, Paules RS. Folate deficiency in normal human fibroblasts leads to altered expression of genes primarily linked to cell signaling, the cytoskeleton and extracellular matrix. *J Nutr Biochem.* 2007 Aug; 18 (8):541-52.
- 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.
- Kohli SS, Kohli VS. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012; 16:64-72.
- 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(2): 177-84.
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS. Mutation in IRF6 cause van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet.* 2002; 32(2): 285-89.
- 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.* 2004a; 134(11): 3106-13.
- Krapels IP, van Rooij IA, Ocké MC, van Cleef BA, Kuijpers-Jagtman AM, Steegers-Theunissen RP. Maternal dietary B vitamin intake, other than

- folate, and the association with orofacial cleft in the offspring. *Eur J Nutr*. 2004b; 43(1): 7-14.
- 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): 280-8.
 - 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.
 - Lehman OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS. Fox's in development and disease. *Trends Genet*. 2003; 19:339–344.
 - Leite FP, Callegari-Jacques SM, Carvalho BA, Kommers T, Matte CH, Raimann PE et al. Y-STR analysis in Brazilian and South Amerindian populations. *Am J Hum Biol*. 2008; 20:359–63.
 - Leite FP, Santos SE, Rodríguez EM, Callegari-Jacques SM, Demarchi DA, Tsuneto LT et al. Linkage disequilibrium patterns and genetic structure of Amerindian and non-Amerindian Brazilian populations revealed by long-range X-STR markers. *Am J Phys Anthropol*. 2009; 139:404–12.
 - 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): 31-7.
 - Letra A, Menezes R, Govil M, Fonseca RF, McHenry T, Granjeiro JM, Castilla EE, Orioli IM, Marazita ML, Vieira AR. Follow-up association studies of chromosome region 9q and nonsyndromic cleft lip/palate. *Am J Med Genet A*. 2010 Jul; 152A (7):1701-10.
 - Lidral AC, Moreno LM, Bullard SA. Genetic Factors and Orofacial Clefting. *Semin Orthod*. 2008; 14(2): 103-14.
 - 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. Maternal smoking and oral clefts: the role of detoxification pathway genes. *Epidemiology*. 2008; 19(4): 606-15.
- Little J, Cardy A, Arslan MT, Gilmour M, Mossey PA. Smoking and Orofacial Clefts: A United Kingdom–Based Case-Control Study. *Cleft Palate Craniofac J*. 2004a; 41(4): 381-6.
- Little J, Cardy A, Munger RG. Tobacco smoking and oral clefts: a metaanalysis. *Bull World Health Organ*. 2004b; 82(3): 213-8.
- Little J, Gilmour M, Mossey PA, Fitzpatrick D, Cardy A, Clayton-Smith J et al. Folate and clefts of the lip and palate--a U.K.-based case-control study: Part II: Biochemical and genetic analysis. *Cleft Palate Craniofac J*. 2008; 45(4): 428-38.
- Loffredo LCM, Freitas JAS, Grigolli AAG. Prevalence of oral clefts from 1975 to 1994, Brazil. *Rev Saúde Pública* 2001a; Dec;35(6):571-5.
- 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. 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): 415-9.
- Mangold E, Reutter H, Birnbaum S, et al. Genome-wide linkage scan of nonsyndromic orofacial clefting in 91 families of central European origin. *Am J Med Genet A*. 2009; 149: 2680-94.
- Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet*. 2010. 42: 24-6.
- Mangold E, Ludwig KU, Nöthen MM. Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. *Trends Mol Med*. 2011 Dec; 17 (12):725-33.
- Marazita ML. Segregation analyses. In: Wyszynski DF, editor. *Cleft lip and palate: from origin to treatment*. New York: Oxford University Press. 2002a; pp 222–233.

- 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.* 2002b; 71 pp. 349–364
- 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(2): 161-73.
- Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, et al. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered.* 2009; 68: 151-70.
- Marcucio RS, Cordero DR, Hu D, Helms JA. Molecular interactions coordinating the development of the forebrain and face. *Dev Bio.* 2005; 284(1): 48-61.
- 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): 314-7.
- 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: 1.
- Materna-Kiryluk 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.
- Menegotto BG, Salzano FM. Epidemiology of oral clefts in a large South American sample. *Cleft Palate Craniofac J.* 1991; 28:373–376.

- Meng T, Shi JY, Wu M, Wang Y, Li Y, Liu Y, Zheng Q, Huang L, Shi B. Overexpression of mouse TTF-2 gene causes cleft palate. *J Cell Mol Med*. 2012 Feb 3.
- Meyer KA, Werler MM, Hayes C, Micthell AA. Low maternal alcohol consumption during pregnancy and oral clefts in off spring: the Slone Birth Defects Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2003; 67(7): 509-14.
- 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): 636-43.
- Mitchell LE, Beaty TH, Lidral AC, et al. Guidelines for the design and analysis of studies on nonsyndromic cleft lip and cleft palate in humans: summary report from a Workshop of the International Consortium for Oral Clefts Genetics. *Cleft Palate Craniofac J*. 2002; 39:93–100.
- Molday RS, Zhong M, Quazi F. The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1791:573–583.
- Moreno LM, Mansilla MA, Bullard SA, Cooper ME, Busch TD, Machida J, Johnson MK, Brauer D, Krahn K, Daack-Hirsch S, L'heureux J, Valencia-Ramirez C, Rivera D, López AM, Moreno MA, Hing A, Lammer EJ, Jones M, Christensen K, Lie RT, Jugessur A, Wilcox AJ, Chines P, Pugh E, Doheny K, Arcos-Burgos M, Marazita ML, Murray JC, Lidral AC. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Hum Mol Genet*. 2009 Dec 15; 18 (24):4879-96.
- 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: 127-58.
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet*. 2009; 374(9703): 1773-85.

- Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP. Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clin Genet*. 2006; 69(6): 512-7.
- Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Biedziak B, Paradowska P, Jagodzinski PP. Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010 Jul; 88(7):538-45.
- Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicka K, Biedziak B, Jagodzinski PP. Polymorphic variants at 10q25.3 and 17q22 loci and the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012 Jan; 94(1):42-6.
- Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology*. 1996; 54(1): 27-33.
- Murray J.C. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clinical Genetics*. 2002, 61 (4), pp. 248-256.
- Murray JC, Schutte BC. Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest*. 2004 Jun; 113 (12):1676-8.
- Murray T, Taub MA, Ruczinski I, Scott AF, Hetmanski JB, Schwender H, Patel P, Zhang TX, Munger RG, Wilcox AJ, Ye X, Wang H, Wu T, Wu-Chou YH, Shi B, Jee SH, Chong S, Yeow V, Murray JC, Marazita ML, Beaty TH. Examining Markers in 8q24 to Explain Differences in Evidence for Association With Cleft Lip With/Without Cleft Palate Between Asians and Europeans. *Genet Epidemiol*. 2012 Apr 16.
- Murthy J, Bhaskar L. Current concepts in genetics of nonsyndromic clefts. *Indian J Plast Surg*. 2009 Jan-Jun; 42(1):68-81.
- Natsume N, Kawai T, Ogi N, Yoshida W. Maternal risk factors in cleft lip and palate: case control study. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000; 38(1): 23-5.
- Nikopensius T, Ambrozaityte L, Ludwig KU, et al. Replication of novel susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate

- on chromosome 8q24 in Estonian and Lithuanian patients. *Am J Med Genet.* 2009; 149A:2551–2553
- Nikopensius T, Birnbaum S, Ludwig KU, Jagomägi T, Saag M, Herms S, Knapp M, Hoffmann P, Nöthen MM, Metspalu A, Mangold E. Susceptibility locus for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 10q25 confers risk in Estonian patients. *Eur J Oral Sci.* 2010 Jun; 118(3):317-9.
 - 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 Aug; 161(8):753-8.
 - 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. *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): 297-9.
 - Pan Y, Zhang W, Du Y, Tong N, Han Y, Zhang H, Wang M, Ma J, Wan L, Wang L. Different roles of two novel susceptibility loci for nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population. *Am J Med Genet A.* 2011 Sep; 155A(9):2180-5.
 - 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): 507-11.
 - 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): 839-43.
 - 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): 193-7.

- Park JW, McIntosh I, Hetmanski JB. Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. *Genet Med*. 2007; 9:219–227.
- Parra EJ, Marcini A, Akey J, Martinson J, Batzer MA, Cooper R, Forrester T, Allison DB, Deka R, Ferrell RE, Shriver MD. Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *Am J Hum Genet*. 1998; 63: 1839-51
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 177-82.
- Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. 2011 Feb 16;6(2):e17063
- Pena SDJ, Bortolini MC. Pode a genética definir quem deve se beneficiar das cotas universitárias e demais ações afirmativas? *Estud Av*. 2004; 18: 31-50.
- Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L, et al. Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat*. 2004; 24: 104-5.
- 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): 327-31.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000a; Jun; 155 (2):945-59.
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet*. 2000b; Jul; 67 (1):170-81.

- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen RP, Pennacchio LA, Schutte BC, Murray JC. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet.* 2008; Nov; 40(11):1341-7.
- Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 2012; 49:73-91.
- Rajabian MH, Sherkat M. An epidemiologic study of oral clefts in Iran: analysis of 1,669 cases. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000; 37(2): 191-6.
- Reutter H, Birnbaum S, Lacava AD, et al. Family-based association study of the MTHFR polymorphism C677T in patients with nonsyndromic cleft lip and palate from central Europe. *Cleft Palate Craniofac J.* 2008; 45: 267-71.
- Rittler M, Liascovich R, Lopez-Camelo J, Catilla EE. Parental consanguinity in specific types of congenital anomalies. *Am J Med Genet.* 2001; 102(1): 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; Feb 15;169(4):505-14.
- Rodriguez-Pinilla E, Martinez-Frias ML. Corticosteroids during pregnancy and oral clefts: a case-control study. *Teratology.* 1998; 58(1): 2-5.
- Rojas-Martinez A, Reutter H, Chacon-Camacho O, Leon-Cachon RB, Munoz-Jimenez SG, Nowak S, Becker J, Herberz R, Ludwig KU, Paredes-Zenteno M, Arizpe-Cantú A, Raeder S, Herms S, Ortiz-Lopez R, Knapp M, Hoffmann P, Nöthen MM, Mangold E. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population: Evidence for IRF6 and variants at 8q24 and 10q25. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010 Jul; 88(7):535-7.

- 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 genotypeenvironment 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): 775-85.
- Salahshourifar I, Wan Sulaiman WA, Halim AS, Zilfalil BA. Mutation screening of IFR6 among families with non-syndromic oral clefts and identification of two novel variants: Review of the literature. *Eur J Med Genet*. 2012; Mar 3.
- Salzano FM, Bortolini MC. *The Evolution and Genetics of Latin American Populations*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2002.
- 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): 180-3.
- Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol*. 2000 Feb; 18 (2):233-4.
- Schutte BC, Murray JC. The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet*. 1999; 8 (10):1853-9. Review.
- Shaw GM, Croen LA, Curry CJ. Isolated oral cleft malformations: associations with maternal and infant characteristics in a California population. *Teratology*. 1991 Mar; 43(3):225-8.
- Shaw GM, Lammer EJ. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts. *J Pediatr*. 1999; 134(3): 298-303.
- 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(6): 475–84

- Shaw GM, Carmichael SL, Laurent C, Rasmussen SA. Maternal nutrient intakes and risk of orofacial clefts. *Epidemiology*. 2006; 17(3): 285-91.
- 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(1): 76-90.
- 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(7641): 432-34.
- Slavotinek AM, Chao R, Vacik T, Yahyavi M, Abouzeid H, Bardakjian T, Schneider A, Shaw G, Sherr EH, Lemke G, Youssef M, Schorderet DF. VAX1 mutation associated with microphthalmia, corpus callosum agenesis, and orofacial clefting: the first description of a VAX1 phenotype in humans. *Hum Mutat*. 2012; Feb;33(2):364-8.
- Sokol RJ, Delaney-Black V, Nordstrom B. Fetal alcohol spectrum disorder. *JAMA*. 2003; 290(22): 2996-9.
- 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.
- Spilson SV, Kim HJ, Chung KC. Association between maternal diabetes mellitus and newborn oral cleft. *Ann Plast Surg*. 2001; 47:477–481.
- Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1972 Jan-Feb; 27(1):5-6.
- Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet*. 2004 Apr 1; 13 Spec No 1:R73-81.
- Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. 1991. Epidemiological and genetic study in 207 cases of oral clefts in Alsace, north-eastern France. *J Med Genet*. 1991; May; 28:325–329.

- Stuppia L, Capogreco M, Marzo G, La Rovere D, Antonucci I, Gatta V, Palka G, Mortellaro C, Tete S. Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate. *J Craniofac Surg.* 2012; 22:1722-1726.
- Tachikawa M, Watanabe M, Hori S, Fukaya M, Ohtsuki S, Asashima T, Terasaki T. Distinct spatio-temporal expression of ABCA and ABCG transporters in the developing and adult mouse brain. *J Neurochem.* 2005; 95:294–304.
- 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.
- 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.
- Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S, Penegar S, Chandler I, Gorman M, Wood W, Barclay E, Lubbe S, Martin L, Sellick G, Jaeger E, Hubner R, Wild R, Rowan A, Fielding S, Howarth K; CORGI Consortium, Silver A, Atkin W, Muir K, Logan R, Kerr D, Johnstone E, Sieber O, Gray R, Thomas H, Peto J, Cazier JB, Houlston R. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet.* 2007 Aug; 39 (8):984-8.
- 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 Rooij IA, Groenen PM, van Drongelen M, Te Morsche RH, Peters WH, Steegers-Theunissen RP. Orofacial clefts and spina bifida: N-acetyltransferase phenotype, maternal smoking, and medication use. *Teratology.* 2002; 66(5): 260-6.
- 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): 689-94.
- Venza M, Visalli M, Venza I, Torino C, Tripodo B, Melita R, Teti D. Altered binding of MYF-5 to FOXE1 promoter in non-syndromic and CHARGE-associated cleft palate. *J Oral Pathol Med*. 2009; Jan 38(1):18-23.
 - Vieira AR, Karras JC, Orioli IM, Castilla EE, Murray JC. Genetic origins in a South American clefting population. *Clin Genet*. 2002; 62(6): 458-63.
 - 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): 64.
 - 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): 538-45.
 - 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, Marazita ML, Goldstein-McHenry T. Genome-wide scan finds suggestive caries loci. *J Dent Res*. 2008b; 87(5): 435-9.
 - Vieira AR. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res*. 2008; 87(2): 119-25.
 - Wang PW, Eisenbart JD, Cordes SP, Barsh GS, Stoffel M, Le Beau MM. Human KRML (MAFB): cDNA cloning, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. *Genomics*. 1999; Aug 1; 59(3):275-81.
 - Wang Y, Li X, Zhu WL, Guo JZ, Song XM, Li SQ, Li Y. Genome-wide and interaction linkage scan for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in two multiplex families in Shenyang, China. *Biomed Environ Sci*. 2010; Oct; 23(5):363-70.
 - Weatherley-White RC, Ben ST, Jin Y, Riccardi S, Arnold TD, Spritz RA. Analysis of genomewide association signals for nonsyndromic cleft

- lip/palate in a Kenya African cohort. *Am J Med Genet Part A*. 2011; 155A:2422-2425.
- Wehby GL, Murray JC. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Diseases*. 2010; 16(1): 11-9.
 - Werler MM, Lammer EJ, Rosenberg L, Mitchell AA. Maternal alcohol use in relation to selected birth defects. *Am J Epidemiol*. 1991; 134(7): 691-8.
 - WHO Human Genetics Programme. Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies: report of WHO meetings on 105 international collaborative research on craniofacial anomalies. Geneva: World Health Organization, 2002.
 - Wu T, Liang KY, Hetmanski JB, Ruczinski I, Fallin MD, Ingersoll RG et al. Evidence of gene-environment interaction for the IRF6 gene and maternal multivitamin supplementation in controlling the risk of cleft lip with/without cleft palate. *Hum Genet*. 2010: 23.
 - Xu MY, Deng XL, Tata LJ, Han H, Chen XH, Liu TY, Chen QS, Yao XW, Tang SJ. Case-Control and Family-Based Association Studies of Novel Susceptibility Locus 8q24 in Nonsyndromic Cleft Lip with or Without Cleft Palate in a Southern Han Chinese Population Located in Guangdong Province. *DNA Cell Biol*. 2011; Nov 1
 - Yang Y, Cvekl A. Large Maf Transcription Factors: Cousins of AP-1 Proteins and Important Regulators of Cellular Differentiation. *Einstein J Biol Med*. 2007; 23 : 2–11.
 - Yazdy MM, Honein MA, Xing J. Reduction in orofacial clefts following folic acid fortification of the U.S. grain supply. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2007; 79(1): 16-23.
 - Yildirim M, Seymen F, Deeley K, Cooper ME, Vieira AR. Defining Predictors of Cleft Lip and Palate Risk. *J Dent Res*. 2012; Apr 10.
 - Yuan Q, Blanton SH, Hecht JT. Association of ABCA4 and MAFB with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Am J Med Genet A*. 2011 Jun;155A(6):1469-71.

- 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; Oct; 73(10):1434-7.
- Zeiger JS, Beaty TH. Is there a relationship between risk factors for oral clefts? *Teratology*. 2002; 66(5): 205-8.
- Zeiger JS, Beaty TH, Liang KY. Oral clefts, maternal smoking, and TGFA: a meta-analysis of gene-environment interaction. *Cleft Palate Craniofac J*. 2005; 42(1): 58-63
- Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet*. 2006; 70: 822–8.
- Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y. Rescue of cleft palate in *Msx1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development*. 2002; 129: 4135–4146.
- Zhang TX, Beaty TH, Ruczinski I. Candidate Pathway Based Analysis for Cleft Lip with or without Cleft Palate. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2012; Jan 6; 11(2).
- Zhao L, Saitsu H, Sun X, Shiota K, Ishibashi M. Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting *Bmp4* expression to the dorsal domain. *Mech Dev*. 2010; 127: 62–72.
- Zhu J, Ren A, Hao L, et al. Variable contribution of the MTHFR C677T polymorphism to non-syndromic cleft lip and palate risk in China. *Am J Med Genet A*. 2006; 140: 551-557.
- Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip and palate. *N Engl J Med*. 2004; 351:769–780.



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 "**Validação de polimorfismos gênicos associados à fissura lábio-palatina não-sindrômica na população brasileira**", protocolo nº 122/2010, dos pesquisadores Ricardo Della Coletta, Elizabeth Bagordakis Pinto, Livia Máris Ribeiro Paranaíba, Marcella Rosa Filezio e Maria Giulia Rezende Pucciarelli, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 26/07/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Validation of polymorphisms associated with non-syndromic cleft lip and palate in the Brazilian population**", register number 122/2010, of Ricardo Della Coletta, Elizabeth Bagordakis Pinto, Livia Máris Ribeiro Paranaíba, Marcella Rosa Filezio and Maria Giulia Rezende Pucciarelli, 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 07/26/2011.

Livia M. A. Tenuta
Profa. Dra. Livia Maria Andalo Tenuta
Secretária
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.