



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que a aluna Marcella Rosa Filezio RA 092173 esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “PAPEL DO GENE *GABRB3* NA SUSCETIBILIDADE A FISSURA LÁBIO-PALATINA NÃO-SINDRÔMICA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA” no ano de 2012.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, 28 de setembro de 2012.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ricardo Della Coletta". The signature is fluid and cursive, with a prominent initial 'R'.

Ricardo Della Coletta



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



**“PAPEL DO GENE *GABRB3* NA SUSCETIBILIDADE A
FISSURA LÁBIO-PALATINA NÃO-SINDRÔMICA NA
POPULAÇÃO BRASILEIRA”**

Autora: Marcella Rosa Filézio

Piracicaba 2012

Marcella Rosa Filézio

“PAPEL DO GENE *GABRB3* NA SUSCETIBILIDADE A FISSURA LÁBIO-PALATINA
NÃO-SINDRÔMICA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA”.

Monografia apresentada ao Curso de
Odontologia da Faculdade de Odontologia
de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção
do diploma de Cirurgião Dentista

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Piracicaba

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Filézio, Marcella Rosa, 1991-

F489p Papel do gene GABRB3 na suscetibilidade a fissura
lábio-palatina não-sindrômica na população brasileira /
Marcella Rosa Filézio. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Ricardo Della Coletta.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Polimorfismo. 2. Fenda labial. I. Della Coletta,
Ricardo, 1972- II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que me ajudaram a chegar até aqui e que continuam a acreditar em mim e nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, que me deu a oportunidade de realizar este projeto, desde meu segundo ano.

À Elizabete Bagordakis e Ana Camila pela amizade, paciência e dedicação em me ensinar e me ajudar durante a realização deste trabalho.

A todos os alunos de pós-graduação em Patologia Oral e Biologia Molecular pelo apoio e ajuda durante o período em que estagiei e realizei este trabalho, em especial à Lívia Paranaíba.

Ao CNPq, pela bolsa e oportunidade de apresentar este projeto em congressos.

À minha mãe Marcia, e ao meu tio José Alexandre, pelo apoio e incentivo a seguir essa profissão.

À Marina Marcelloni e Gabriel Girard pela imensurável amizade e apoio durante os bons e maus momentos da graduação.

À minha grande amiga Cristiane Rapozo, por sempre estar disposta a me escutar e ajudar mesmo estando a quilômetros de distância.

EPÍGRAFE

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, pra sempre, à margem de nós mesmos"

Fernando Pessoa

RESUMO

A fissura labial e/ou palatina não-sindrômica (FL/PNS) é uma doença multifatorial com fatores genéticos e ambientais envolvidos na sua patogênese. O gene *GABRB3*, que codifica a subunidade β -3 do receptor GABAA (ácido gama amino butírico), tem emergido como um gene com potencial de susceptibilidade para as FL/PNS, pois sua expressão é considerada essencial para a formação do palato. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de 3 polimorfismos no gene *GABRB3* (rs4477673, rs6576618, e rs981778) em pacientes com FL/PNS. Uma análise caso-controle com 291 pacientes com FL/PNS (231 pacientes com fissura de lábio com ou sem fenda palatina e 60 pacientes com fissura de palato isolado) e 316 indivíduos saudáveis (controles) foi realizada pelo método de discriminação alélica com sondas fluorescentes. Para os três polimorfismos, as distribuições dos genótipos seguiram as proporções de Hardy-Weinberg esperadas no grupo controle, e as frequências dos alelos e genótipos minoritários foram semelhantes entre o grupo controle e o grupo de fissurados, não mostrando diferenças significativas. A análise dos modelos genéticos dominantes e recessivos também não revelou nenhuma diferença na distribuição dos genótipos entre os grupos. Além disso, o haplótipo mais prevalente na população presente foi TCG, mas não foram observadas diferenças em qualquer dos haplótipos testados entre os grupos. Em conclusão, nossos resultados sugerem que os polimorfismos rs4477673, rs6576618 e rs981778 no gene *GABRB3* não estão envolvidos na patogênese das FL/PNS na população brasileira.

PALAVRAS-CHAVE

Polimorfismos; GABRB3; Fissura Labial; Fissura Palatina

ABSTRACT

Nonsyndromic cleft lip and/or palate is a multifactorial disease with both genetic and environmental factors involved in its pathogenesis. The γ -aminobutyric acid receptor type A β -3 subunit (*GABRB3*) gene has emerged as a potential susceptibility gene for nonsyndromic cleft lip and/or palate since its expression was found to be essential to complete formation of the palate. The objective of this study was to evaluate the influence of *GABRB3* polymorphisms in patients with nonsyndromic cleft lip and/or palate. We carried out a case-control analysis of three *GABRB3* polymorphisms (rs4477673, rs6576618, and rs981778) in 291 patients with nonsyndromic cleft lip and/or palate (231 patients with cleft lip with or without cleft palate and 60 patients with isolated cleft palate) and in 316 unaffected controls from Brazil with an allelic discrimination assay with fluorescent probes. For the three polymorphisms, genotype distributions followed the Hardy-Weinberg expected proportions in the control group, and the frequencies of the minor alleles and genotypes were similar between the control and clefting groups, showing no significant differences. The analysis in the dominant and recessive genetic models also revealed no difference in the genotype distribution between groups. Moreover, the most prevalent haplotype in the present population was TCG, but no differences were observed with any of the tested haplotypes between groups. Our results suggest that *GABRB3* rs4477673, rs657673, and rs981778 polymorphisms are not involved in the pathogenesis of nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population.

Keywords: Polymorphism, *GABRB3*; cleft lip; cleft palate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FL/P: Fissura labial e/ou palatina

FL/PNS: Fissura Labial e/ou Palatina Não-sindrômica

FL: Fissura labial

FLP: Fissura Labial e Palatina

FP: Fissura palatina

GABRB3: subunidade β -3 do ácido γ -aminobutírico

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	2
3. Materiais e métodos	2
3.1 Amostras.....	2
3.2 Genotipagem	3
3.3 Análise de dados.....	3
4. Resultados	4
5. Discussão	4
6. Conclusão	6
7. Referências.....	6
8. Tabela 1.....	10
9. Tabela 2.....	11
10. Tabela 3.....	12

1. Introdução

Fissura Labial e/ou palatina não-sindrômica (FL/PNS) (OMIM 119530) representa a malformação congênita mais frequente na região de cabeça e pescoço, com uma prevalência de cerca de 1:800 nascidos vivos em todo o mundo. Sua prevalência varia de acordo com a etnia (africanos: 0.3:1,000; europeus: 1.3:1,000; asiáticos: 2.1:1,000; nativos americanos: 3.6:1,000) e nível socioeconômico¹. No Brasil a prevalência de FL/PNS varia de 0.19 a 1,54:1,000 nascidos vivos^{2,3}. A FL/PNS compreende três formas: fissura labial isolada (FL), fissura labial e palatina (FLP) e fissura palatina isolada (FP). Entretanto, devido as similaridades tanto nas características epidemiológicas quanto no tempo embriológico, FL é considerada uma variante menos grave da FLP e as duas são rotineiramente agrupadas juntas formando um único grupo de fissura labial com ou sem fissura palatina (FL±P) (Jugessur et al., 2011).

A etiologia das FL/PNS, envolvendo fatores genéticos e ambientais, é altamente complexa e sua base molecular continua em grande parte desconhecida¹. Uma das muitas razões que dificultam o melhor conhecimento da etiologia das FL/PNS é que o desenvolvimento craniofacial é um processo altamente complexo que envolve muitos loci gênicos, covariáveis ambientais e moléculas de sinalização⁴. Embora estudos genéticos identificaram vários genes e regiões cromossômicas candidatos a etiologia das FL/PNS, os resultados de diferentes estudos são inconsistentes¹. Até hoje, as associações mais notáveis, que foram replicadas em diferentes populações, são com as variantes de IRF6 e com o *single nucleotide polymorphism* (SNP) rs987525 no locus regulatório 8q24⁵⁻⁸. Uma estratégia que ajudou na identificação de alterações genéticas associadas a FL/PNS é a avaliação de SNPs em genes relacionados ao desenvolvimento craniofacial.

O receptor tipo A subunidade β -3 do ácido γ -aminobutírico (*GABRB3*), um dos quatro membros da família de receptores GABAA, é o mediador primário da rápida transmissão sináptica inibitória no sistema nervoso central⁹. Os receptores GABAA são formados por duas subunidades α , 2 subunidades β e uma subunidade γ ou δ . Camundongos knockout para a subunidade β -3 do gene *GABRB3* exibiram déficit neurológico grave, caracterizada por hiperatividade, falta de coordenação e convulsões¹⁰. Em adição, estes animais apresentavam fissuras palatinas que foram identificados como a causa principal de morte, que ocorre em aproximadamente

90% dos recém-nascidos em 24 h¹¹. Posteriormente, as mutações em *GABRB3* foram descritos nas síndromes que continham epilepsia como uma das manifestações clínicas, enquanto que variantes polimórficas neste gene (SNPs) foram associados com as formas isoladas de epilepsia^{12,13}. Interessantemente, estudos prévios forneceram evidências de uma possível associação entre variantes no gene *GABRB3* e fissuras orais em humanos¹⁴⁻¹⁶. Em um estudo abrangente no formato caso-controle incluindo amostras das Filipinas e Iowa–EUA, Vieira e colaboradores¹⁵ avaliaram nove SNPs no gene *GABRB3*, revelando possível associação de três deles (rs4477673, rs6576618 e rs981778) com as FL/PNS. O objetivo deste estudo caso-controle foi investigar o papel de variantes polimórficas no gene *GABRB3* em pacientes com FL/PNS da população brasileira.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi determinar a frequência de 3 polimorfismos no gene *GABRB3*, rs4477673, rs6576618 e rs981778, em pacientes com FL/PNS e indivíduos controle e avaliar a relação destes polimorfismos gênicos na etiologia das fissuras.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostras

Este estudo incluiu 291 pacientes com FL/PNS recrutados do Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Minas Gerais, Brasil. Todos os pacientes foram cuidadosamente examinados para a presença de anomalias ou síndromes associadas pela equipe no Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Duzentos e trinta e um pacientes foram afetados pela FL±P e 60 pacientes foram afetados pela FP. O grupo controle foi composto por amostras de pacientes em tratamento dental regular, devido a condições não relacionadas a fissuras, na Faculdade de Odontologia do mesmo Centro (n=316).

Todas as amostras foram obtidas entre 2008 e 2010, e controles foram pareados por idade, local de nascimento e ancestralidade. Em um estudo recente,

nós caracterizamos a ancestralidade genômica dessas amostras utilizando um painel de 40 INDELS (do inglês, short insertion-deletion polymorphisms). A ancestralidade média para o grupo com FL/PNS foi estimada em 84.1% Européia, 13.4% Africana e 2.5% Ameríndia, enquanto a ancestralidade no grupo controle foi 89.0% Européia, 8.1% Africana e 2.9% Ameríndia. Não foram observadas diferenças entre os grupos. Foi obtido consentimento livre e esclarecido de todos os participantes ou responsáveis e o estudo ocorreu com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana da FOP-UNICAMP.

3.2. Genotipagem

DNA genômico foi extraído de células da mucosa oral como descrito anteriormente¹⁸. Para testar a associação entre *GABRB3* e FL/PNS, três SNPs (rs4477673, rs657673 e rs981778) foram genotipados (Tabela 1). Estes polimorfismos foram selecionados baseados em suas frequências alélicas próximo a 0.3 (International HapMap Project, www.hapmap.org) e porquê demonstraram uma possível associação com as fissuras orais. A genotipagem foi realizada no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems) pelo método de discriminação alélica com sondas fluorescentes (Assay-on-Demand, Applied Biosystems). Para o controle de qualidade, todas as reações de genotipagem foram repetidas aleatoriamente em 10% das amostras.

3.3. Análise de Dados

A existência do equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle e a frequência alélica e genotípica nos modelos não restritos, dominante e recessivo foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. Para estimar a chance de ocorrência, odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (95% IC) foram calculados. Os haplótipos foram determinados pelo programa PHASE versão 2.1 (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>). O poder de encontrar um valor significativo de 5% ($p \leq 0,05$) foi calculado com o programa G*Power 3.1²⁰.

4. Resultados

As frequências alélicas e genóticas entre os grupos controle e FL/PNS estão retratados na Tabela 2. As frequências dos genótipos para todos os polimorfismos nos controles não revelaram diferenças estatisticamente significantes comparadas às esperadas sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 2).

Para o polimorfismo rs4477637, a frequência do alelo C foi similar entre os grupos controle (38,6%), FL±P (40,1%) e FL (38,4%). As frequências dos genótipos variantes (TC e CC) foram levemente maiores nos grupos FL±P e FP quando comparado ao grupo controle, mas não foi observada diferença significativa. Por outro lado, o alelo A e as variantes genóticas (CA e AA) do polimorfismo rs6576618 foram mais prevalentes no grupo controle do que nos grupos com FL±P e FP, mas também não mostraram diferença significativa. No polimorfismo rs981778, o alelo A e os genótipos GA/AA foram mais frequentes nos grupos com FL/PNS do que no grupo controle, mas não revelou nenhuma associação com FL±P ou FP. Além disso, as análises dos modelos genéticos dominante e recessivo também não revelaram diferença na distribuição entre os grupos.

Os resultados da análise dos haplótipos estão retratados na Tabela 3. Utilizando a análise PHASE, oito haplótipos com os 3 polimorfismos de *GABRB3* foram observados em nossa casuística, e a combinação TCG foi a mais prevalente na presente população. Entretanto, não observamos diferenças na frequência dos haplótipos entre os grupos. Com o tamanho atual do nosso grupo de amostras, o poder de detectar associação em pelo menos 1 dentre os 3 polimorfismos foi de aproximadamente 90%.

5. Discussão

FL/PNS é uma anomalia congênita com significativo impacto médico, psicológico e social. Evidências indicam que essa anomalia representa uma doença complexa na quais heterogeneidades clínica e genética são observadas¹. A base genética das fissuras orais continua como uma questão em aberto, e a identificação de fatores de risco para FL/PNS tem sido um assunto de intensa pesquisa. Por essas razões, nós

investigamos a associação entre as variantes genéticas em *GABRB3* e FL/PNS, uma vez que os membros do sistema GABA são candidatos promissores para a patogênese de fissuras orais.^{9,11,20,21} Nossos resultados são consistentes com a falta de associação entre os polimorfismos rs4477673, rs657673 e rs981778 do gene *GABRB3* e a patogênese das FL/PNS na população brasileira.

Estudos prévios investigaram o papel das variantes de *GABRB3* nas fissuras orais, mas os resultados foram inconsistentes. O primeiro estudo foi realizado por Tanabe *et al.*²² em um grupo de pacientes japoneses afetados por FL/PNS. Esses autores concluíram que o gene *GABRB3* não está envolvido com a patogênese de fissuras orais em pacientes japoneses, mas deve ser levado em consideração que os resultados obtidos não foram submetidos por nenhuma análise estatística. Posteriormente, Scapoli *et al.*¹⁴ investigaram os mesmos marcadores em 38 famílias italianas com FL/PNS e mostraram uma evidencia significativa de associação. Curiosamente, os polimorfismos individuais do gene *GABRB3* não foram associados com FL/PNS em um segundo estudo de pacientes japoneses, mas um haplótipo contendo 6 marcadores do gene foi significativamente mais frequente nos pacientes com FL/PNS do que nos controles, revelando o envolvimento do gene *GABRB3* na patogênese da FL/PNS na população japonesa. Vieira *et al.*¹⁵ analisaram nove SNPs no gene *GABRB3* em populações de Iowa-EUA e das Filipinas e demonstraram uma associação entre várias variantes e FL/PNS. Como neste estudo, a falta de associação entre polimorfismos em *GABRB3* e FL/PNS foi relatado em populações da Lituânia e Irlanda.^{23,24}

Estes resultados inconsistentes que caracterizam o papel de *GABRB3* na patogênese das FL/PNS podem estar relacionados com a heterogeneidade genética intrínseca da doença ou a baixa penetrância do gene. Em suporte ao último argumento, recentes estudos de associação genômica (*genome-wide association studies, GWAS*), os quais baseiam-se na comparação dos vários polimorfismos comuns entre os casos e os controles, não identificaram *GABRB3* como um gene candidato para a associação a um risco aumentado ou diminuído para o desenvolvimento de FL/PNS. Em adição, outra possível razão para a ausência de associação no nosso estudo inclui o pequeno grupo de amostras, especialmente no grupo com FL, fazendo com que associações modestas não sejam identificadas.

Ainda, a parcela de contribuição genética para FL/PNS também é influenciada pelo ambiente local, por consanguinidade e etnia da população.²⁵ Por exemplo, na América do Sul, a contribuição genética para as FL/PNS foi estimada em 70%,²⁶ na Finlândia em 17%,²⁷ na China em 77%,²⁸ e na Itália em 84%.²⁹ Considerando que o Brasil possui uma das populações mais heterogêneas do mundo, resultante de cinco séculos de mistura interétnica entre pessoas de três continentes, incluindo colonizadores europeus (majoritariamente representados pelos portugueses), escravos africanos e ameríndios³⁰, a etnia pode ter um efeito na contribuição genética para FL/PNS no Brasil.

6. Conclusão

Nossos achados são consistentes com uma ausência de envolvimento dos polimorfismos rs4477673, rs6576618 e rs981778 de *GABRB3* com FL/PNS na população brasileira estudada, demonstrando que a presença destes polimorfismos pode não ter um papel importante na etiologia da FL/PNS. A mistura étnica complexa da população brasileira pode ter contribuído para este resultado.

7. Referências

1. Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J* 2012;49(1):73-91.
2. Martelli-Junior H, Porto LCVP, Barbosa DRB, Bonan PRF, Freitas AB, Coletta RD. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in Minas Gerais State, between 2000–2005. *Braz Oral Res* 2007;21(4):314-317.
3. 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.
4. Helms JA, Cordero D, Tapadia MD. New insights into craniofacial morphogenesis. *Development* 2005;132(5):851-856.

5. Zuccherro T, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, *et al.* Interferon regulatory factor (IRF6) is a modifier for isolated cleft lip and palate. *Engl J Med* 2004;351:769-780.
6. Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, *et al.* Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet* 2009;41(4):473-477.
7. Grant SF, Wang K, Zhang H, Glaberson W, Annaiah K, Kim CE, *et al.* A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr* 2009;155(6):909-913.
8. Salahshourifar I, Sulaiman WA, Zilfalil BA, Halim AS. Contribution of variants in and near the IRF6 gene to the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Malay population. *Am J Med Genet A* 2011;155(9):2302-2307.
9. Hagiwara N, Katarova Z, Siracusa LD, Brilliant MH. Nonneuronal expression of the GABAA-3 subunit gene is required for normal palate development in mice. *Developmental Biology* 2003;254:93-101.
10. Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21(1):16-19.
11. Homanics GE, DeLorey TM, Firestone LL, Quinlan JJ, Handforth A, Harrison NL, Krasowski MD, Rick CE, Korpi ER, Makela R, *et al.* Mice devoid of gamma-aminobutyrate type A receptor beta3 subunit have epilepsy, cleft palate, and hypersensitive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4143-4148.
12. Lachance-Touchette P, Martin C, Poulin C, Gravel M, Carmant L, Cossette P. Screening of *GABRB3* in French-Canadian families with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia* 2010;51(9):1894-1897.
13. Macdonald RL, Kang JQ, Gallagher MJ. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J Physiol* 2010;1:588(Pt 11):1861-1869.
14. Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Bodo M, Tognon M, *et al.* Linkage disequilibrium between *GABRB3* gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate. *Hum Genet* 2002;110:15-20.

15. Vieira AR, Howe A, Murray JC. Studies of gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3 (*GABRB3*) and glutamic acid decarboxylase 67 (*GAD67*) with oral clefts. *Am J Med Genet A* 2008;146A:2828-2830.
16. Inoue H, Kayano S, Aoki Y, Kure S, Yamada A, Hata A, *et al.* Association of the *GABRB3* gene with nonsyndromic oral clefts. *Cleft Palate Craniofac J* 2008;45:261-266.
17. Spina V. A proposed modification for the classification of cleft lip and cleft palate. *Cleft Palate J* 1973;10:251-252.
18. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* 2007;18:148-152.
19. Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, *et al.* High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 2001;11:1262-1268.
20. Ding R, Tsunekawa N, Obata K. Cleft palate by picrotoxin or 3-MP and palatal shelf elevation in GABA-deficient mice. *Neurotoxicol Teratol* 2004;26:587-592.
21. Oh WJ, Noggle SA, Maddox DM, Condie BG. The mouse vesicular inhibitory amino acid transporter gene: expression during embryogenesis, analysis of its core promoter in neural stem cells and a reconsideration of its alternate splicing. *Gene* 2005;351:39-49.
22. Tanabe A, Taketani S, Endo-Ichikawa Y, Tokunaga R, Ogawa Y, Hiramoto M. Analysis of the candidate genes responsible for non-syndromic cleft lip and palate in Japanese people. *Clin Sci* 2000;99:105-111.
23. Morkuniene A, Steponaviciut D, Utkus A, Kucinskas V. Few associations of candidate genes with nonsyndromic orofacial clefts in the population of Lithuania. *J Appl Genet* 2007;48:89-91.
24. Carter TC, Molloy AM, Pangilinan F, Troendle JF, Kirke PN, Conley MR, *et al.* Testing Reported Associations of Genetic Risk Factors for Oral Clefts in a Large Irish Study Population. *Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology* 2010; 88:84-93.

25. Brito LA, Cruz LA, Rocha KM, Barbara LK, Silva CBF, Bueno DF, *et al.* Genetic Contribution for Non-Syndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate (NS CL/P) in Different Regions of Brazil and Implications for Association Studies. *Am J Med Genet Part A* 2011;155A(7):1581-1587.
26. Menegotto BG, Salzano FM. Clustering of malformations in the families of South American oral cleft neonates. *J Med Genet* 1991;28:110-113.
27. Nordstrom RE, Laatikainen T, Juvonen TO, Ranta RE. Cleft-twin sets in Finland 1948–1987. *Cleft Palate Craniofac J* 1996;33:340-347.
28. Hu DN, Li JH, Chen HY, Chang HS, Wu BX, Lu ZK, Wang DZ, Liu XG. Genetics of cleft lip and cleft palate in China. *Am J Hum Genet* 1982;34:999-1002.
29. Calzolari E, Milan M, Cavazzuti GB, Cocchi G, Gandini E, Magnani C, *et al.* S. Epidemiological and genetic study of 200 cases of oral cleft in the Emilia Romagna region of northern Italy. *Teratology* 1988;38:559-564.
30. 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(1):177-82.

Tabela 1. Localização e frequência do alelo menor dos SNPs no gene *GABRB3* investigados neste estudo.

SNP	Posição no cromossomo*	Localização	Alelo	Frequência do alelo menor**
rs4477673	27062506	Intron	T>C	0,395
rs6576618	27044605	Intron	C>A	0,338
rs981778	26957240	Intron	G>A	0,262

*Referência: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. **Referência: 1000 genomas

Tabela 2. Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos de *GABRB3* no grupo controle e no grupo com FL/PNS

Polimorfismo	HWE Valor de p	Grupo Controle n (%)	FL±P n (%)	OR (95% IC)/valor de p	FP n (%)	OR (95% IC)/valor de p
rs4477673						
Alelo						
T		388 (61,4)	277 (59,9)	Referência	74 (61,6)	Referência
C		244 (38,6)	185 (40,1)	1,06 (0,83-1,36)/0,63	46 (38,4)	0,98 (0,66-1,47)/0,95
Genótipo						
TT		125 (39,6)	85 (36,8)	Referência	22 (36,7)	Referência
TC	0,37	138 (43,7)	107 (46,3)	1,14 (0,78-1,66)/0,49	30 (50,0)	1,23 (0,67-2,25)/0,49
CC		53 (16,8)	39 (16,9)	1,08 (0,66-1,78)/0,75	8 (13,3)	0,85 (0,36-2,05)/0,73
rs6576618						
Alelo						
C		376 (59,5)	291 (62,9)	Referência	76 (63,3)	Referência
A		256 (40,5)	171 (37,1)	0,86 (0,67-1,10)/0,24	44 (36,7)	0,85 (0,56-1,27)/0,43
Genótipo						
CC		116 (36,7)	92 (39,8)	Referência	24 (40,0)	Referência
CA	0,62	144 (45,6)	107 (46,3)	0,93 (0,64-1,36)/0,73	28 (46,7)	0,94 (0,51-1,71)/0,83
AA		56 (17,7)	32 (13,9)	0,72 (0,43-1,20)/0,21	8 (13,3)	0,69 (0,29-1,63)/0,39
rs981778						
Alelo						
G		409 (64,7)	279 (60,4)	Referência	70 (58,3)	Referência
A		223 (35,3)	183 (39,6)	1,20 (0,94-1,54)/0,14	50 (41,7)	1,31 (0,88-1,95)/0,18
Genótipo						
GG		138 (43,7)	90 (38,9)	Referência	25 (41,7)	Referência
GA	0,38	133 (42,1)	99 (42,8)	1,14 (0,78-1,65)/0,48	20 (33,3)	0,83 (0,44-1,56)/0,56
AA		45 (14,2)	42 (18,3)	1,43 (0,87-2,35)/0,15	15 (25,0)	1,84 (0,89-3,79)/0,07

HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg, FL±P: fissura labial com ou sem fissura palatina, FP: fissura palatina isolada.

Tabela 3. Distribuição dos haplótipos de *GABRB3* nos grupos controle e FL/PNS.

Haplótipo	Grupo Controle	FL±P	OR (95% CI)/valor de p	CP	OR (95% CI)/p value
TCG	18,4%	17,6%	Reference	18,1%	Reference
TAG	16,7%	15,2%	0,95 (0,69-1,29)/0,73	15,1%	0,91 (0,54-1,53)/0,73
TCA	14,5%	15,1%	1,09 (0,79-1,50)/0,58	17,6%	1,23 (0,74-2,05)/0,41
CCG	13%	12,1%	0,97 (0,69-1,36)/0,89	10,7%	0,84 (0,47-1,49)/0,55
TAA	12,3%	13,4%	1,14 (0,82-1,60)/0,43	13,2%	1,09 (0,63-1,87)/0,75
CAG	10,3%	9,2%	0,93 (0,65-1,34)/0,71	8,3%	0,82 (0,44-1,52)/0,52
CCA	9,2%	10,6%	1,21 (0,84-1,74)/0,29	10,7%	1,19 (0,66-2,12)/0,55
CAA	5,6%	6,8%	1,27 (0,83-1,94)/0,27	6,3%	1,15 (0,57-2,32)/0,68

Ordem do haplótipos: rs4477673, rs6576618 e rs981778. FL±P: fissura labial com ou sem fissura palatina, FP: fissura palatina isolada..