



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

LILIANNY QUERINO ROCHA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM *BMP4* (PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 4) NA SUSCEPTIBILIDADE DAS FISSURAS LABIAIS COM OU SEM FISSURA PALATINA NÃO-SINDRÔMICA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Piracicaba

2022

**LILIANNY QUERINO ROCHA DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM *BMP4* (PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 4) NA SUSCEPTIBILIDADE DAS FISSURAS LABIAIS COM OU SEM FISSURA PALATINA NÃO-SINDRÔMICA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Coorientador: Prof. Dr. Renato Assis Machado

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Lilianny Querino Rocha de Oliveira, e orientada pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta.

Piracicaba

2022

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

OL4a Oliveira, Lilianny Querino Rocha de, 1997-  
Análise de polimorfismos genéticos em *BMP4* (proteína morfogenética óssea 4) na susceptibilidade das fissuras labiais com ou sem fissura palatina não-sindrômica na população brasileira / Lilianny Querino Rocha de Oliveira. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Ricardo Della Coletta.  
Coorientador: Renato Assis Machado.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Proteína morfogenética óssea 4. 2. Fenda labial. 3. Fenda palatina. 4. Polimorfismo (Genética). 5. Brasil - População. I. Della Coletta, Ricardo, 1972-. II. Machado, Renato Assis, 1989-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Analysis of genetic polymorphism in *BMP4* (bone morphonegetic protein 4) in the susceptibility of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the brazilian population

**Palavras-chave em inglês:**

Bone morphogenetic protein 4

Cleft lip

Cleft palate

Genetic polymorphisms

Brazil - Population

**Área de concentração:** Histologia e Embriologia

**Titulação:** Mestra em Biologia Buco-Dental

**Banca examinadora:**

Renato Assis Machado [Coorientador]

Aline Cristiane Planello

Luiz Evaristo Ricci Volpato

**Data de defesa:** 29-07-2022

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Buco-Dental

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4842-5756>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7187612438532533>



**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 29 de julho de 2022, considerou a candidata LILIANNY QUERINO ROCHA DE OLIVEIRA aprovada.

PROF. DR. RENATO ASSIS MACHADO

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ALINE CRISTIANE PLANELLO

PROF. DR. LUIZ EVARISTO RICCI VOLPATO

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

## **AGRADECIMENTOS**

À Nossa Senhora, que sempre foi minha mãe, minha protetora, minha confidente e minha casa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, que tive a honra de ser guiada em mais uma etapa da minha vida acadêmica. Obrigada por acreditar em mim, incentivar e de forma gentil e muito paciente compartilhar seus conhecimentos e reflexões.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Renato Assis Machado, pelo acolhimento, amizade e sensatos ensinamentos.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Leonora Tavares-Bastos, que me ensinou os primeiros passos no mundo científico, pela amizade que fizemos e por tantos ensinamentos passados que vou levar por toda a vida.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques, coordenador do Programa Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (PPGBBD- FOP/UNICAMP), pelos gentis e sábios conselhos.

Aos professores e colaboradores do PPGBBD- FOP/UNICAMP da área de concentração em Histologia e Embriologia, Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, Profa. Dra. Ana Paula de Souza, Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques, Profa. Dra. Aline Cristiane Planello, e Profa. Dra. Débora Campanella Bastos, pelas lições que me ajudaram a compreender um pouco do universo da biologia molecular.

À minha eterna dupla de clínica da graduação Cynthia Cavalcante, pela amizade mais linda e sincera que felizmente pude receber.

Aos meus amigos de infância e aos que a Odontologia me presenteou: Amanda Mazzaro, Bianca Figueiredo, Camila Menezes, Cinthya Arias, Douglas Esposito, Emilyane Santana, Gilberto Lucas, Hellen Sobrino, Iva Ayres, Larissa Lopes, Patrícia Albuquerque, Raphael Marques, Thaynan Escarião, Vitor Marinho, Yasmin Montenegro, e Yaskara Sanjines, por compartilharem histórias, proporcionarem alegria, e dividirem as angústias.

Aos meus avós Josefa e João, pelo amor incondicional e por serem meu porto-seguro.

Às minhas mães Rosângela e Wilma, e minha irmã Lylian, por me ensinarem o que é o amor e serem a minha família.

Ao meu noivo Guilhermie, por me amar, ser o meu lar, apoiar minhas escolhas e vibrar pelas minhas conquistas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

## RESUMO

As fissuras orofaciais não-sindrômicas são as malformações congênitas mais comuns na região craniofacial, com uma etiologia multifatorial e complexa. Embora vários genes e *loci* genéticos foram descritos como de risco para estas malformações congênitas, a susceptibilidade genética varia entre as populações. Isso é particularmente importante na população brasileira, na qual cada indivíduo apresenta níveis variados de ancestralidade, principalmente africana, ameríndia e europeia. Como a associação de variantes no gene da proteína morfogenética óssea 4 (*BMP4*) com as fissuras labiais com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FL±PNS) parece variar em relação a etnia e os poucos estudos com a população brasileira foram realizados sem considerar a proporção de ancestralidade de cada participante e com amostras de tamanho relativamente pequeno, o objetivo deste estudo caso-controle foi avaliar a associação dos tag-SNPs rs11623717, rs17563, rs2071047 e rs2761887 em *BMP4* com a susceptibilidade das FL±PNS na população brasileira, além de verificar o impacto das interações destas variantes com genes envolvidos na via de sinalização celular de *BMP4*, incluindo *FGFR1*, *GREM1*, *NOG*, *VAX1* e o locus 4p16.2. Para isso, 800 pacientes com FL±PNS (232 com fissura labial não-sindrômica - FLNS e 568 com fissura lábiopalatina não-sindrômica - FLPNS) e 881 controles foram genotipados com ensaios de discriminação alélica com sondas fluorescentes discriminantes. A ancestralidade de cada amostra foi determinada com um painel discriminante contendo 40 marcadores de ancestralidade da população brasileira. As interações SNP-SNP entre os polimorfismos em *BMP4* e nos genes *FGFR1*, *GREM1*, *NOG* e *VAX1* e o locus 4p16.2 foi realizada por uma análise de regressão logística ajustada para gênero e ancestralidade genômica. Considerando a amostra total, nenhuma associação significativa entre os SNPs em *BMP4* e o risco de desenvolvimento de FL±PNS, FLNS e FLPNS foi identificada. Contudo, quando apenas os pacientes com alta ancestralidade africana foram considerados, uma associação significativa com o SNP rs2761887 foi observada [(OR<sub>hom</sub>: 2,16; 95%IC: 1,21-3,85; p=0.01) e (OR<sub>rec</sub>: 2,05; 95%IC: 1,21-3,47); p=0.0006]. A análise de haplótipos, baseado em combinações de 2, 3 e 4 SNPs, também não revelou nenhuma associação significativa. Dezesesseis interações SNP-SNP de risco para as FL±PNS envolvendo *BMP4* e os SNPs em *FGFR1*, *GREM1*, *NOG* e *VAX1* e no locus 4p16.2 foram identificadas. Conjuntamente, nossos resultados demonstram um risco aumentado de FL±PNS em indivíduos brasileiros com enriquecimento da ancestralidade africana na presença do polimorfismo rs2762887 em *BMP4* e revelam que as interações entre *BMP4* e *FGFR1*, *GREM1*, *NOG* e *VAX1* e o locus 4p16.2 podem estar relacionadas com a patogênese dessa malformação craniofacial comum.

**Palavras-chave:** Proteína Morfogenética Óssea 4; Fissura labial; Fissura Palatina; Polimorfismo; População brasileira.

## ABSTRACT

Non-syndromic orofacial clefts are the most common congenital malformations in the craniofacial region, with a multifactorial and complex etiology. Although several genes and genetic loci have been described as risk for these congenital malformations, the genetic susceptibility varies among populations. This is particularly important in the Brazilian population, in which each individual has varying levels of ancestry, mainly African, Amerindian and European. As the association of variants in the bone morphogenetic protein 4 (*BMP4*) gene with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL±P) seems to vary in relation to ethnicity and the few studies performed in the Brazilian population were carried out without considering the proportion of ancestry of each participant and with samples of relatively small size, the objective of this case-control study was to evaluate the association of the tag-SNPs rs11623717, rs17563, rs2071047 and rs2761887 in *BMP4* with the susceptibility of NSCL±P in the Brazilian population, and to verifying the impact of the interactions of these variants with genes involved in the *BMP4* cell signaling pathway, including *FGFR1*, *GREM1*, *NOG*, *VAX1* and the 4p16.2 locus. For this, 800 patients with NSCL±P (232 with non-syndromic cleft lip only - NSCLO and 568 with non-syndromic cleft lip and palate - NSCLP) and 881 controls were genotyped with allelic discrimination assays with fluorescent discriminant probes. The ancestry of each sample was determined with a discriminant panel containing 40 markers of ancestrality of the Brazilian population. SNP-SNP interactions between polymorphisms in *BMP4* and in the *FGFR1*, *GREM1*, *NOG* and *VAX1* genes and the 4p16.2 locus were performed by a logistic regression analysis adjusted for gender and genomic ancestry. In general, no significant associations between the SNPs in *BMP4* and the risk of developing NSCL±P, NSCL and NSCLP were identified. However, when only patients with high African ancestry were analyzed, a significant association with the SNP rs2761887 was observed [(OR<sub>hom</sub>: 2.16; 95%CI: 1.21-3.85; p=0.01) and (OR<sub>rec</sub>: 2.05; 95%CI: 1.21-3.47); p=0.0006]. Haplotype analyses, based on combinations of 2, 3 and 4 SNPs, also did not reveal significant associations. Sixteen significant SNP-SNP interactions for NSCL±P involving *BMP4* and the SNPs at *FGFR1*, *GREM1*, *NOG* and *VAX1* and at locus 4p16.2 were identified. Together, our results demonstrate an increased risk of NSCL±P in Brazilian individuals with enrichment of African ancestry in the presence of the *BMP4* rs2762887 polymorphism and reveal that interactions between *BMP4* and *FGFR1*, *GREM1*, *NOG* and *VAX1* and the 4p16.2 locus may be related to the pathogenesis of this common craniofacial malformation.

**Keywords:** Bone Morphogenetic Protein 4; Cleft lip; Cleft Palate; Polymorphism; Brazilian population.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) do gene BMP4	42
Tabela 2 -	Distribuição por sexo e proporções de ancestralidade entre os grupos de pacientes incluídos no estudo	45
Tabela 3 -	Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FL±PNS)	47
Tabela 4 -	Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio não-sindrômica (FLNS)	48
Tabela 5 -	Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio e palato não-sindrômica (FLPNS)	49
Tabela 6 -	Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FL±PNS) com baixa ancestralidade africana	51
Tabela 7 -	Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FL±PNS) com alta ancestralidade africana	52
Tabela 8 -	Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FLNS) com baixa ancestralidade africana	53
Tabela 9 -	Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FLNS) com alta ancestralidade africana	54
Tabela 10 -	Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FLPNS) com baixa ancestralidade africana	55
Tabela 11 -	Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FLPNS) com alta ancestralidade africana	56
Tabela 12 -	Análises de haplótipos dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene BMP4 no estudo caso-controle de FL±PNS	57

Tabela 13 - Interações entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) 61  
preditivos de risco para fissura labial com ou sem fissura  
palatina não sindrômica (FL±PNS), com base no modelo de  
redução da dimensionalidade multifatorial

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAMBI - homólogo do inibidor de membrana ligado à membrana de BMP e activina

*BMP* – Proteína morfogenética óssea

*BMP4* – Proteína morfogenética óssea 4

BMPR-I – Receptor da proteína morfogenética óssea, tipo I

BMPR-II – Receptor da proteína morfogenética óssea, tipo II

CAP - Proteína regulador do citoesqueleto actina associada à ciclase

Crispld2 - Domínio LCCL da proteína secretora rica em cisteína 2

CID-10 - Classificação internacional de Doenças versão 10

*COL2A1* – Colágeno tipo II, alpha 1

Co-Smad – Smad de parceiro comum

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

*FGF* – Fator de crescimento fibroblástico

*FGF10* - Fator de crescimento fibroblástico 10

*FGFR1* – Receptor do fator de crescimento fibroblástico 1

*FGFR2* - Receptor do fator de crescimento fibroblástico 2

FL - Fissura labial

FL±P - Fissura de lábio e/ou palato

FL±PNS - Fissura lábio e/ou palato não sindrômica

FL±P - Fissura labial com ou sem fissura palatina

FLP - Fissura lábiopalatina

FOX - Forkhead

FP - Fissura palatina

GREM1- Gremilin 1

*GSTM1* - Glutathione S-transferase mu 1

*GSTT1* - Glutathione S-transferase theta 1

GWAS - Estudos de associação de larga escala genômica

HWE - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

IC - Intervalo de confiança

*IRF6* – Fator regulador de interferon 6

MAF - Frequência do alelo menor

mL - Mililitros

mM - Milimolar

*MSX1* - MSH homeobox 1

*MTHFR* - Metilenotetrahidrofolato redutase

*NOG* - Noggin

OR - Odds ratio

*PAX9* - Paired box 9

*PTCH* - Patched

R-Smad – Smad regulado por receptor

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - rotação por minuto

*RUNX2* - família de fatores de transcrição RUX2

SDS - Dodecil sulfato de sódio

*Shh* - Sonic hedgehog

SMAD - Mothers against decapentaplegic homolog

*TCOF1* – Síndrome Treacher-Collins-Franceschetti 1

*TGF-β* – Fator de crescimento transformante beta

*TIMP3* – Inibidor tecidual de metalopeptidase 3

*TNP1* – Proteína transicional nuclear 1

Tris - Tris-(hidroximetil)-aminometano

*VAX1* - Ventral anterior homeobox 1

*WNT* - Wingless

*WNT3* - Wingless-type MMTV integration site family, member 3

µg - Microgramas

µl - Microlitro

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	19
2.1 Classificação das FONS .....	19
2.2 Morfogênese do lábio e palato e a associação com FONS .....	21
2.3 Etiologia das FONS.....	26
2.3.1 Fatores ambientais e suas interações com fatores genéticos .....	26
2.3.2 Fatores genéticos .....	30
2.4 <i>BMP4</i> .....	31
2.5 Interações genéticas na via de sinalização de <i>BMP4</i> durante o desenvolvimento craniofacial .....	35
2.6 Delineamento experimental .....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Comitê de Ética em Pesquisa .....	41
4.2 Pacientes .....	41
4.3 Amostras de DNA .....	41
4.4 Seleção dos Tag-SNPs.....	42
4.5 Genotipagem e Avaliação da ancestralidade genômica .....	42
4.6 Análise de interação SNP-SNP .....	43
4.7 Análise estatística .....	43
6 DISCUSSÃO .....	62
7 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS .....	81
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa .....	81
Anexo 2 – Relatório de verificação de originalidade e prevenção de plágio .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

As fissuras orofaciais são as malformações congênitas mais comuns na região craniofacial, afetando em média 1:1000 recém-nascidos vivos em todo mundo com incidência variável influenciada por vários aspectos, incluindo etnia, região geográfica, exposições ambientais, diferenças nos programas de atendimento pré-natal e status socioeconômico (Dixon et al., 2011; Salari, 2021). Indivíduos de populações asiáticas e nativas americanas são mais frequentemente afetados (1:500), seguidos por europeus (1:1.000), enquanto populações de ascendência africana têm a menor incidência (1:2.500) (Beaty et al., 2010; Mossey et al., 2009; Salari, 2021). Como a população brasileira é muito miscigenada, sua prevalência varia entre 1:650 a 1:2.700 nascidos vivos de acordo com o estado ou região estudada, sendo a maior prevalência na região sul e a menor na região nordeste (Martelli et al., 2007; Rodrigues et al., 2009; Firmino e Sousa, 2017).

A maioria das fissuras orofaciais ocorrem de forma isolada sem a ocorrência de outros fenótipos associados, as chamadas fissuras orofaciais não-sindrômicas (FONS) (Dixon et al., 2011). Estas representam cerca de 70% de todos os casos de fissuras de lábio com ou sem fissura palatina e 50% dos casos de fissura palatina. De forma geral, as fissuras orofaciais ocorrem predominantemente devido à não ou má união dos processos de desenvolvimento durante o início da embriogênese, e o mecanismo de pelo qual dá-se essa malformação ainda não está totalmente esclarecido, podendo estar ligado a componentes genético, ambientais ou a interrelação entre eles (Mossey et al., 2009; Machado et al., 2016). Existem vários sistemas de classificação das fissuras orofaciais, mas todos tradicionalmente levam em consideração a localização anatômica e a extensão do fenótipo. A classificação mais popular, que usa o forame incisivo como referência, divide as fissuras orofaciais em 3 principais grupos: fissura labial isolada (FL), fissura labiopalatina (FLP) e fissura palatina isolada (FP). Devido às semelhanças tanto nas características epidemiológicas quanto no momento embriológico, muitos estudos combinam FL e FLP em um grupo único, denominado FL±P (Marazita, 2012).

A etiologia das FONS é de caráter multifatorial e complexo, devido ao seu componente genético relacionada a uma grande variedade de genes candidatos combinada a fatores de risco ambientais (Dixon et al., 2011). Os fatores ambientais de risco para o desenvolvimento de FONS são diversos, dentre eles podemos destacar a idade avançada de ambos os genitores, o tabagismo materno e à exposição à fumaça de cigarro durante a gestação (tabagismo passivo), uso materno de medicamentos, consanguinidade entre os pais e etilismo materno (Lorente et al., 2000; Kallen, 2003; Honein et al., 2007; Sabbagh et al., 2014). Enquanto que a suplementação de ácido fólico e sulfato ferroso, principalmente durante o período pré-concepcional, está bem estabelecida como fator ambiental protetivo (Van Beynum et al., 2010; Zarante et al., 2009).

O fator de risco genético no desenvolvimento das FONS é atribuído a variáveis em genes candidatos que atuam durante o desenvolvimento craniofacial, porém o mecanismo exato pelo qual ocorre essa relação com o desenvolvimento de FONS ainda é desconhecido (Hammond e Dixon, 2022). Em relação ao estudo do componente genético no risco de desenvolvimento das FONS, diferentes estratégias são utilizadas para melhor avaliação de sua participação, são elas: estudos de ligação, sequenciamento direto do DNA, estudos de associação de larga escala genômica (GWAS) e, mais recentemente, estudos de sequenciamento direcionado (ClefSeq), e estudos de interações genéticas entre polimorfismos em genes candidatos ao desenvolvimento de fissuras orofaciais (Leslie, 2022; Chattopadhyay e Lu, 2019). Dentre as estratégias utilizadas na busca por elucidar a etiologia genética das FONS, diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) localizados em genes candidatos foram estudados em diferentes populações, entre eles, podemos destacar o gene *BMP4* (proteína morfogenética óssea 4) (Wang et al., 2021).

O gene *BMP4* faz parte da grande família das BMPs, que são moléculas sinalizadoras pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Diferentes aspectos do desenvolvimento esquelético e cartilaginoso são regulados por *BMP4* devido a seu papel na indução da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e na maturação de condrócitos (Wan e Cao, 2005). Durante o desenvolvimento craniofacial, a sinalização de *BMP4* atua nos processos de proliferação, apoptose e diferenciação celular (Parada e Chai, 2012). Além disso, *BMP4* é altamente expresso na região do terço médio da face durante a fusão das

proeminências faciais que formam as partes laterais do lábio superior e palato secundário, mediando principalmente os processos de apoptose celular (Gong e Guo, 2003). A formação da FL foi um dos principais fenótipos observados em camundongo *knockout* para *Bmp4* (Liu et al., 2005). O primeiro estudo caso-controle em humanos associando *BMP4* e FONS analisou a atuação do SNP rs17563 em crianças chinesas, as quais apresentaram um risco aumentado para FLPNS na presença do alelo C (Lin et al., 2008). De modo geral, a presença do alelo variante C foi associada com um risco aumentado em populações de diferentes origens, incluindo as da China, Chile, Índia e Irã (Savitha et al., 2015; Saket et al., 2016; Blanco et al., 2017; Rafighdoost et al., 2017; Hao et al., 2018; Wang et al., 2021), porém em estudos com populações brasileiras, o efeito foi protetor (Araújo et al., 2012; Antunes et al., 2013;). Este é um fato bastante intrigante, mas é importante considerar que os estudos com as populações brasileiras foram realizados com amostras reduzidas e não consideraram a ancestralidade genômica.

Além disso, ao realizar uma revisão da literatura foi possível verificar que três meta-análises investigaram a associação de SNPs em *BMP4* e o risco para o desenvolvimento das FONS. Duas destas meta-análises confirmaram a associação de risco para FL±PNS na população chinesa, enquanto que na população brasileira foi encontrado um efeito protetor (Hu et al., 2015; Li et al., 2017). Em 2018, nosso grupo realizou uma revisão sistemática e meta-análise para mapear os marcadores genéticos associados as FONS na população brasileira e, entre os vários sinais positivos, o alelo variante C em rs17563 foi significativamente associado a uma diminuição do risco de FL±PNS, gerando um OR em meta-análise de 0,68 (95% IC: 0,51-0,90,  $p=0,008$ ) (Machado et al., 2018). Evidências da associação entre FL±PNS e os genótipos de rs17563 em um modelo homozigoto (CC vs. TT, OR: 0,50, 95% IC: 0,39-0,66,  $p<0,0001$ ) foram confirmadas. É importante ressaltar que a conclusão sobre rs17563 desta meta-análise com amostras brasileiras foi baseada em apenas 2 estudos e em uma amostra pequena, e conforme revelado pelos valores de  $Tau^2$  e  $I^2$ , os efeitos foram heterogêneos, merecendo mais estudos para determinar a real associação de variantes em *BMP4*, incluído o polimorfismo rs17563, com a suscetibilidade das FL±PNS na população brasileira. Diante do conflito exposto acerca da presença de associação de polimorfismos em *BMP4* e o desenvolvimento de FONS, o presente estudo caso-controle busca explorar o papel dos tag-SNPs

rs11623717, rs17563, rs2071047, rs2761887 e rs4898820 em *BMP4* no desenvolvimento de FL±PNS na população brasileira.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Classificação das FONS

As FONS podem apresentar variedade de fenótipos entre os pacientes acometidos, ocorrendo sob formas mais brandas como fissuras submucosas até as mais severas com maior comprometimento orofacial, e conseqüentemente maior impacto na qualidade de vida do paciente (Dixon et al., 2011). De forma a padronizar o diagnóstico das FONS, diversos sistemas de classificação foram desenvolvidos, sendo o sistema de Spina o mais utilizado (Spina, 1973). Este sistema leva em consideração a posição anatômica da fissura em relação ao forame incisivo, dividido em quatro grupos: grupo I, fissuras pré-forame incisivo completa ou incompleta (FL); grupo II, fissuras que transpassam o forame incisivo (FLP); grupo III, fissuras pós-forame incisivo completa ou incompleta (FP), e grupo IV de fissuras raras que não envolvem o forame incisivo. Por convenção, as FL e as FLP podem ser classificadas conjuntamente como um único fenótipo de gravidade variável, chamado FL±P devido a características epidemiológicas e embrionárias (Marazita et al., 2012), pois mesmo que lábio e palato primário possuam origem embrionária distintas do palato secundário, uma falha na fusão labial adequada pode indiretamente afetar a fusão palatina (Jiang et al., 2006; Mossey et al., 2009). Essa variabilidade na gravidade do fenótipo pode ser visualizada também na FP, que pode se manifestar de forma mais grave com fenótipo de FP completa isolada sem fusão da mucosa palatina ou se apresentar de forma mais leve com a FP incompleta ou a fusão adequada da mucosa palatina, sendo chamada fissura palatina submucosa (FPSM) que na maioria dos casos é diagnosticada apenas na fase adulta por meio de exames de imagem solicitados para outras finalidades ou mais comumente devido a presença de fala anasalada (McBride et al., 2016).

Devido a seu espectro variável, uma classificação precisa e padronizada quanto ao fenótipo da FONS é de extrema importância principalmente quanto ao estudo de sua epidemiologia, pois sistemas de classificação mais específicos possibilitam maior subagrupamento de fissuras, e conseqüentemente facilita a catalogação de causas genéticas e mecanismos ambientais envolvidos no processo de formação específico de um tipo de FONS (Dixon et al, 2011; Grosen et al., 2010). Outros sistemas de classificação foram desenvolvidos ao longo dos anos na tentativa

de incluir outras características presentes nos fenótipos das FONS que não são contempladas no sistema proposto por Spina, que leva em consideração apenas o ponto de vista embriológico (Rodrigues et al., 2018). Entretanto, a criação de diferentes sistemas de classificação das FONS acarreta na dificuldade por parte do clínico em realizar uma descrição adequada do quadro clínico do paciente, principalmente no que se refere a posição anatômica e descrição da extensão da fissura, que são os principais componentes dessa patologia e as maiores limitações da maioria dos sistemas (Houkes et al., 2021).

Na busca por sanar esse problema de classificação, Kriens (1989) desenvolveu o sistema LAHSHAL que utiliza como referência a anatomia e a lateralidade da fissura codificadas com letras e símbolos. Cada letra representa uma estrutura anatômica: o lábio (L), alvéolo (A) e palatos duro e mole (H), quando essas estruturas são completamente afetadas pela fissura uma letra maiúscula é assinalada, e quando a estrutura anatômica não está completamente fissurada, uma letra minúscula é anotada. Já os símbolos como asterisco (\*) e ponto (.) são utilizados para contemplar formas submucosas e lados não afetados respectivamente, de modo a permitir que a classificação de LAHSHAL descreva e registre todos os tipos de FONS de forma concisa e simples (Kriens, 1989; McBride et al., 2016). O método de LAHSHAL poderia ser o sistema de classificação mais utilizado no mundo devido à sua flexibilidade em possibilitar a inclusão de apresentações raras de FONS, e exatidão da descrição o que facilita a análise estatística, entretanto, muitos clínicos ainda julgam esse sistema como pouco reprodutível e apontam dificuldades para sua utilização como a necessidade de treinamento prévio devido ao seu grande detalhamento gráfico, pois os mesmo estão habituados a utilizar o sistema de registro CID-10 (Classificação Internacional de Doenças versão 10). Porém este é um sistema de registro e não de classificação, e por isso é mais simplório (Houkes et al., 2021).

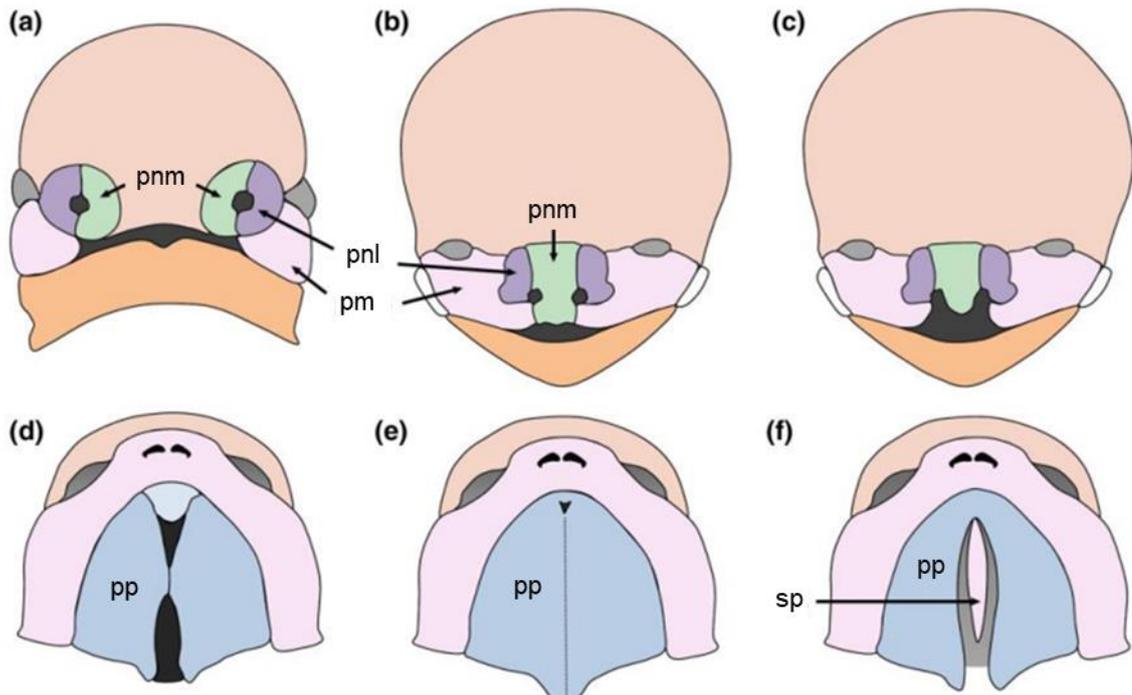
O CID-10 é um sistema mundial de registro de patologias, idealizado pela Organização Mundial da Saúde e utilizado em mais de 100 países (OMS, 2014). O CID-10 é o atual sistema de registro utilizado no Brasil para descrição de morbidades no SUS (DataSUS, 2020). Apesar de bem difundido no Brasil, o CID-10 é um sistema de codificação e não de classificação, pois utiliza um conjunto de códigos que permite o registro de uma determinada entidade clínica de maneira a facilitar o armazenamento, classificação e análise dessa informação (Allori et al., 2016). Apesar

de permitir o fácil armazenamento de uma informação clínica, sistemas de codificação apresentam limitações no que se refere a precisão da descrição das características clínicas analisadas (Aylsworth et al., 2015). Em relação ao registro de fissuras orofaciais, o CID-10 apresenta 16 códigos para descrição, subdivididos em eixos (recebe a letra Q seguida do número que descreve o tipo de fissura) e subeixos (recebe um número de 1 a 8 precedido de um ponto ao final do número do eixo), sendo 3 eixos: fissuras palatinas isoladas (eixo Q35.0), fissuras labiais isoladas (eixo Q36.0) e fissuras que envolvem lábio e palato (eixo Q.37.0). Para cada eixo, têm-se cinco, três e oito subeixos, respectivamente. Nestes subeixos é possível descrever características associadas a essas fissuras, como a lateralidade, extensão (completa ou incompleta) e quais estruturas anatômicas estão envolvidas, como úvula, palatos duro e mole e lábio (Taub e Silver, 2016). Os registros clínicos de anomalias congênitas são importantes nos estudos de epidemiologia de uma doença/alteração, pois fornecem dados de fatores etiológicos ambientais, prevalência e descrição específica da doença (McBride et al., 2016). Nesse sentido, o registro de nascidos vivos com a doença apresenta também dados relevantes para estes estudos, e no Brasil é realizado pelo Sistema Nacional de Nascidos Vivos (SINASC; (<http://svs.aids.gov.br/dantps/cgiae/sinasc/>), uma documentação do Ministério da Saúde que fornece informações também sobre as mães, pré-natal e parto dos recém-nascidos (Souza e Roncalli, 2017). Neste registro, também chamado de Declaração de Nascido Vivo (DNV) (<http://svs.aids.gov.br/dantps/cgiae/sinasc/>), há um campo de preenchimento obrigatório sobre a presença de malformações congênitas e que também utiliza o sistema CID-10 para descrição da anomalia encontrada (Nunes et al., 2010). Apesar da obrigatoriedade de registro de defeitos congênitos ao nascimento, ainda existem lacunas nas frequências obtidas por esses registros *versus* dados da literatura sobre a prevalência de fissuras orofaciais nas diferentes regiões do território brasileiro, devido ao fato de o CID-10 não utilizar um sistema abrangente como o de Spina, por exemplo, ajustado para especificações sobre gravidade e subtipos clínicos de fissuras (Nascimento et al., 2018).

## **2.2 Morfogênese do lábio e palato e a associação com FONS**

O desenvolvimento embrionário do complexo craniofacial têm início ao redor da 4ª semana de vida intrauterina, quando as células da crista neural migram para os

primórdios faciais, e somadas às células ectodérmicas e mesodérmicas, dão início a formação dos arcos branquiais e proeminências faciais (Marazita e Mooney 2004; Compagnucci et al., 2021). Após esse período, as proeminências frontonasal, maxilar e mandibular formam os limites da cavidade oral primitiva. Após a formação do placóide nasal, a proeminência frontonasal é dividida em dois processos nasais laterais e um processo nasal medial, em seguida os processos nasais mediais se fundem com os processos maxilares e nasais laterais, formando o lábio superior aproximadamente na 6ª semana de vida. A ocorrência de falhas em algum desses eventos resultará em formação das FL. Ao se aproximar da 8ª semana de vida intrauterina, dá-se início a formação do palato secundário a partir dos processos palatinos que iniciam seu desenvolvimento lateralmente a língua em formação e imediatamente atrás do palato primário. As cristas palatinas se reorientam acima da língua em movimento orientado em sentido anteroposterior, e direcionando-se para a linha média onde se encontraram e se fundem. Os epitélios da borda medial de cada apófise palatina aderem e se fundem em sentido anteroposterior formando a fusão epitelial da linha média e concomitantemente se fundem ao palato primário. Ao chegar na 10ª semana de gestação, o mesênquima aprisionado no palato se diferencia em osso e músculo para a formação de palato duro e mole, respectivamente, cobertas pela mucosa oral. A partir da união entre palatos duro e mole há a formação de uma sequência de espessamentos epiteliais no sentido transversal, as chamadas pregas palatinas, e a primeira prega dessa sequência está localizada exatamente no limite entre os palatos. Do mesmo modo, a ocorrência de falha em quaisquer desses processos dará origem a FP (Jiang et al., 2018; Hammond e Dixon, 2022) (Figura 1).



**Figura 1.** Desenvolvimento craniofacial humano. (a) e (b) Formação do lábio superior a partir da fusão dos processos maxilares (pm) e processos nasais medial e laterais (pnm e pnl, respectivamente). (c) Falhas durante a embriogênese do lábio resultam em FL, em alguns casos bilateral. (d) e (e) Desenvolvimento do palato secundário por meio da fusão entre os processos palatinos (pp) na linha média. (f) Falhas durante a palatogênese resultam em FP com septo nasal (sp) passível de visualização. Adaptado de Hammond e Dixon, 2021.

Em decorrência dessa diferença na origem embrionária, FL e FP podem ocorrer de forma conjunta ou isolada, podendo inclusive não serem segregadas na mesma família (Mossey et al., 2009). Durante esse período do desenvolvimento embrionário, têm-se extrema vulnerabilidade a efeitos genéticos e teratogênicos de origem ambiental (Seelan et al., 2012), visto que, ao integrar resultados de estudos genéticos humanos com achados de estudos sobre o processo embrionário em animais, pôde-se entender que todo o processo de desenvolvimento craniofacial é finamente regulado por genes reguladores por meio de moléculas sinalizadoras, as quais mediam os processos de interações epitélio-mesenquimais, apoptose, proliferação celular e diferenciação celular. Diversos genes já foram caracterizados atuando nesses processos, tais como as famílias de: *FGFs* (fator de crescimento fibroblástico), *BMPs* (proteína morfogenética óssea), *MSX* (Msh Homeobox) e *Shh* (Sonic hedgehog) (Rahimov et al., 2012; Hammond e Dixon, 2021), entre muitos outros.

Os eventos de proliferação celular são regulados por meio de fatores de crescimento, que são proteínas que se ligam a receptores da superfície celular gerando uma reação em cadeia que culmina na ativação de fatores de transcrição. Por sua vez, estes fatores de transcrição ligam-se às regiões reguladoras do DNA, iniciando os eventos de transcrição do DNA (Wurdak et al., 2005; Wan e Cao, 2005; Kouskoura et al., 2011). Defeitos nos fatores de crescimento ou em seus receptores tem o potencial de causar FONS, esse efeito foi demonstrado por meio de estudos em modelos animais (Wan e Cao, 2005; Riley et al., 2007). Essa dinâmica de sinalização dos fatores de crescimento pode ser visualizada durante a palatogênese, onde a proteína Shh, expressa no epitélio dos processos palatinos, se ligar a seu receptor Ptch (patched) no mesênquima subjacente e ativa Smo (smoothened), regulando as ciclinas D1 e D2 no ciclo celular, possibilitando assim a proliferação celular (Rice et al., 2005; Lan e Jiang, 2009). Também no mesênquima palatino há a expressão de FGF10 (fator de crescimento fibroblástico 10), que media a proliferação epitelial ao se ligar ao seu receptor FGFR2 (receptor 2 do fator de crescimento fibroblástico). A perda de função em FGF10 ou FGFR2 acarreta em menor proliferação do epitélio e aumento da apoptose, gerando fissura palatina (Rice et al., 2007; Mossey et al., 2009). Assim como na palatogênese, a sinalização realizada por Shh também está presente na morfogênese do lábio, regulando a expressão de genes da família *FOX* (forkhead box). Em embriões de camundongo com inibição da via Shh pela administração de ciclopamina, a regulação negativa de nove genes *FOX*, que são expressos na região mediana do lábio superior, gera a insuficiência do processo nasal medial, impedindo suas fusões com os processos maxilares, formando FL (Everson et al., 2017).

Dentre os eventos de regulação celular que ocorrem durante o desenvolvimento craniofacial, a regulação da apoptose é considerada o mais importante (Wei et al., 2008). De modo geral, a apoptose consiste num conjunto de mudanças controladas, canônicas e distinguíveis na estrutura da célula, tais como: mudança morfológica da membrana e citoplasma celular, com arredondamento e redução de volume, respectivamente; condensação e marginalização da cromatina (picnose) e posterior fragmentação do DNA (cariorrexe); redução das organelas, com fragmentação e rearranjo do citoesqueleto celular; este desacoplamento do citoesqueleto leva a formação de irregularidades na membrana plasmática e eventual formação de fragmentos celulares em corpos apoptóticos; liberação de vesículas

extracelulares com conteúdo derivado das células que sofreram apoptose (Compagnucci et al., 2021). A apoptose apresenta dois mecanismos a depender da forma de ativação, uma forma intrínseca (ou mitocondrial) e uma forma extrínseca (mediada por receptores), mas ambas têm como finalidade a ativação da cascata de caspases que iniciarão a clivagem de componentes celulares (Fuchs e Steller, 2011). Durante o desenvolvimento craniofacial a apoptose está presente principalmente em regiões de fusão, e sua via intrínseca especificamente é desencadeada por eventos locais como a mudança local no fator de crescimento e estresse no metabolismo celular (Compagnucci et al., 2021).

Os eventos de migração celular ocorrem durante todo o processo de morfogênese, atuando desde a gastrulação até a embriogênese dos órgãos (He et al., 2014). As células da crista neural, por exemplo, são uma população de células migratórias específicas de vertebrados, originadas na região dorsal do tubo neural e que migram para diversas regiões do embrião, incluindo a região craniofacial em desenvolvimento onde irão contribuir na formação de cartilagem e osso (Minoux e Rijli, 2010). Para que essas células migrem, uma série de modificações do seu citoesqueleto são necessárias, alterando sua morfologia, causando a perda da fixação célula-célula e assim permitindo a migração para diferentes tecidos (Strobl-Mazzulla e Bronner, 2012; Rogers et al., 2013). Defeitos no processo de migração celular já foram associados ao surgimento de fissuras orofaciais (Nikopensius et al., 2010). O gene *CRISPLD2* (domínio LCCL da proteína secretora rica em cisteína 2), um membro da superfamília CAP (proteína regulador do citoesqueleto actina associada à ciclase), apresenta papel importante durante a migração celular e seu *knockdown* em embriões de peixes-zebra resulta na expressão anormal de marcadores de células da crista neural levando a deformidades craniofaciais graves (Minoux e Rijli, 2010; Yuan et al., 2012). Erros na tradução da proteína *Crispld2* durante o desenvolvimento craniofacial também em peixe-zebra levaram a migração anormal das células da crista neural, diminuição da proliferação celular e aumento da apoptose, gerando a formação anormal da cartilagem da região orofacial, de modo a confirmar que *Crispld2* exerce papel fundamental na sobrevivência e migração dessas células durante o desenvolvimento craniofacial inicial e tardio (Swindell et al., 2015). Em humanos, diversos estudos confirmaram a associação de polimorfismos em *CRISPLD2* e o risco de desenvolvimento de FL±PNS (Ge et al., 2018). Na população brasileira, o risco de

desenvolvimento de FPNS foi associado ao SNP rs4783099 em *CRISPLD2* (Messeti et al., 2016).

## **2.3 Etiologia das FONS**

Os estudos genéticos e epidemiológicos indicam que a etiologia das FONS apresenta caráter multifatorial e complexo com a contribuição de fatores genéticos e ambientais (Mangold et al., 2011). Desse modo, o fenótipo das FONS resulta de uma somatória entre os padrões genéticos herdados e a exposição à teratógenos durante a formação fetal e uma melhor compreensão sobre como esses fatores interagem resultará em uma possibilidade de prevenção, tratamento e prognóstico (Lebby et al., 2010; Fell et al., 2021).

### **2.3.1 Fatores ambientais e suas interações com fatores genéticos**

Embora existam estudos que demonstrem fatores ambientais isolados como fatores de risco para as FONS, estima-se que a interação gene-ambiente contribua com 50% a 80% na formação das FONS (Marazita e Mooney, 2004). Esta expressiva influência está relacionada diretamente a extensa lista de agentes teratogênicos que influenciam o desenvolvimento do lábio e palato, embora apenas alguns deles apresentem evidências consistentes, como tabagismo, etilismo, deficiências nutricionais (ácido fólico e outros suplementos), doenças infectocontagiosas, uso de medicação sem orientação médica (principalmente medicações antifolato), exposições laborais de risco como exposição à radiação ionizante, e mais recentemente os fatores de risco maternos como doenças maternas preexistentes, entre elas, a diabetes e a obesidade (Rahimov et al., 2012; Candotto et al., 2019; Altoé et al., 2020).

Considera-se que o tabagismo materno é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de FONS, além de ser um dos agentes mais estudados (Dixon et al., 2011). Várias meta-análises associaram o uso do cigarro ao desenvolvimento de fissuras orofaciais, com a primeira delas sendo realizada por Wyszynski et al. (1997). Este estudo analisou 11 artigos publicados entre os anos de 1966 a 1996, e considerou que o risco de FL±P na presença de tabagismo materno é de 11% e o de FP é de 12%. A meta-análise mais recente sobre a associação do tabagismo no risco de desenvolvimento de fissuras orofaciais relata que há uma associação moderada,

porém os estudos analisados apresentam baixa qualidade em suas metodologias (Fell et al., 2021). Em uma população do sudeste brasileiro foi encontrada associação de risco 1,5 vezes maior de mães fumantes gerarem filhos com FLP do que mães não fumantes (OR: 1,49; IC 95%: 1,15-1,93;  $p < 0,002$ ) com risco maior quando a criança era do sexo masculino (Martelli et al., 2015). Embora o tabagismo seja sempre associado ao lado materno por grande parte dos estudos, a meta-análise de Oldereid et al. (2018) encontrou um risco de o tabagismo paterno gerar fissuras orofaciais (OR: 1,5; IC 95%: 1,10-2,4), porém não é possível afirmar se esse efeito se dá diretamente sobre o espermatozoide ou por um efeito passivo nos ovócitos ou no feto (tabagismo passivo). O tabagismo paterno, assim como o materno, já foi associado ao desenvolvimento de FONS em população brasileira da região sudoeste (Neves et al., 2016). A fumaça do cigarro é composta por mais de 4.000 substâncias nocivas diferentes, entre elas estão a nicotina, alcatrão, partículas de carbono e monóxido de carbono (Rooij et al., 2001). Sabe-se que produtos da fumaça do cigarro podem causar danos a angiogênese do embrião que associado a vasoconstricção induzida pela nicotina, gera hipóxia dos tecidos em formação, tendo como uma de suas consequências a não fusão dos processos palatinos em modelo animal, acarretando em fenótipo de FP (Vieira e Dattilo, 2018). Além disso, diversos estudos demonstram que fatores ambientais podem interagir com fatores genéticos, como a relação que ocorre entre tabagismo materno e polimorfismos genéticos nos genes *GSTM1* (glutathione S-transferase mu 1), *GSTT1* (glutathione S-transferase theta 1), *RAD51* (RAD51 Recombinase), *RUNX2* (família de fatores de transcrição RUX2), *SLC2A9* (família de transportador de soluto 2) e *WDR1* (domínio de repetição 1) que geram risco de desenvolvimento de FL±PNS em várias populações mundiais (Lammer et al., 2005; Machado et al., 2016a; Shi et al., 2007; Chevrier et al., 2008; Wu et al., 2014; Wu T et al., 2012). Apesar de tão amplamente estudado e saber-se que o tabagismo afeta o mecanismo de metilação do DNA fetal, o mecanismo exato pelo qual o tabagismo interage com a expressão gênica durante a morfogênese do lábio e palato ainda não está claro (Leite et al., 2002; Leiby et al., 2010). E, ainda que existam muitos trabalhos que avaliam o risco de desenvolvimento de FONS e sua relação com o tabagismo materno, uma meta-análise realizada por Fell et al. (2021) aponta que grande parte desses estudos apresentam baixa qualidade o que compromete a

validação de seus achados, e isso deve principalmente ao não ajuste de variáveis de risco como a idade dos pais, consumo de álcool e obesidade.

O fato de vários estudos apoiarem a associação de risco entre o tabagismo materno e FONS levanta a hipótese de que haja interação entre tabagismo e polimorfismos genéticos em genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial e em variantes envolvidas em mecanismos de desintoxicação (Shi et al., 2007; Christensen et al., 2008; Jianyan et al., 2010). A meta-análise realizada por Shi et al. (2007) confirmou que polimorfismos no gene *GSTT1* (Glutathione S-transferase Theta 1) na presença de tabagismo materno elevam o risco de desenvolvimento de FL±PNS na população dinamarquesa. O gene *RUNX2*, expresso em ossos faciais e da calota craniana tanto durante o desenvolvimento embrionário, quanto durante a vida adulta também apresentou maior risco de desenvolvimento de FL±PNS na presença de tabagismo materno (Wu et al., 2012).

O álcool é considerado um dos teratógenos mais consumidos no mundo, e a ingestão deste principalmente nos períodos iniciais da gravidez é o principal fator causal de diversas alterações neonatais (Leite et al., 2002). Contudo, a exposição materna ao álcool tem sido considerada controversa por apresentar evidências inconsistentes, influenciada, entre outros fatores, pela dose e estágio gestacional de exposição (Dixon et al., 2011). A revisão sistemática e meta-análise mais recente, realizada por Yin et al. (2019), analisou artigos publicados entre 1950 a 2019 e registrou uma chance de ocorrência (*odds ratio*) de desenvolvimento de FL±PNS e FPNS por mães que consumiram bebidas alcólicas durante a gestação de 1,00 (IC 95% 0,87 a 1,15) e 1,02 (IC 95% 0,92 a 1,14), respectivamente, quando comparado a mães não alcoólatras. Também não houve evidências de que há relação entre dose-resposta para o consumo de álcool e o desenvolvimento de FONS, apesar de quatro dos estudos analisados terem encontrado associação de risco significativa para FL±PNS no grupo de mães com maior consumo de álcool. Os mesmos achados foram encontrados por Bell et al. (2014), que ao analisarem 33 estudos (23 caso-controle e 10 estudos de coorte), apesar da grande heterogeneidade no desenho dos estudos, não encontraram quaisquer relações entre o consumo de álcool por gestantes e o desenvolvimento das FONS. Krapels et al. (2006) consideraram que a inconclusividade acerca do etilismo ser um fator de risco para as FONS está atrelada a dificuldade em medir a quantidade, frequência e tempo do consumo pelas gestantes,

além disso, este consumo muitas vezes está associado a outros agentes teratogênicos, como cigarro e drogas ilícitas. Em estudo de interação gene-ambiente, Bezerra et al. (2014) encontraram risco de desenvolvimento de FL±PNS para o polimorfismo no gene *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase) para gestantes que fizeram ingestão de bebidas alcólicas e que não fizeram suplementação com ácido fólico.

Apesar de alguns medicamentos terem seu potencial teratogênico bem conhecido, como no caso da talidomida e a classe de anticonvulsivantes, outros aparentam risco inócuo, mas podem atuar em diversas fases da morfogênese como agentes geradores de malformações, incluindo os antibióticos e anti-inflamatórios (Abdo e Machado, 2005; Dinis-Oliveira, 2014). Na classe dos anticonvulsivantes, o ácido valpróico é o medicamento de maior efeito teratogênico, até 7 vezes maior que anticonvulsivantes comuns, e com capacidade de gerar FL±P (Tanoshima et al., 2015). Dentre a lista de medicamentos aparentemente inofensivos pela população geral, os corticoesteróides estão entre os mais utilizados no tratamento de mulheres em idade fértil e seu uso quase dobrou nos últimos anos (Bjørn et al., 2015). Em meta-análise realizada por Wyllie et al. (2000), a utilização de prednisona durante o primeiro trimestre de gravidez gerou um risco 3,4 vezes maior de desenvolvimento de fissuras orofaciais.

Outras substâncias químicas além de medicamentos produzem risco ao feto em desenvolvimento. O uso de drogas ilícitas como cocaína e ecstasy foi associada ao risco de defeitos congênitos, porém os poucos estudos realizados com fissuras orofaciais foram inconclusivos (Werler et al., 2003). Substâncias químicas de efeito teratogênico também podem ser encontradas em ambientes de trabalho, seja ele rural ou urbano, e incluem solventes e metais pesados em áreas industriais e agrotóxicos nas zonas agrícolas (Chevrier et al., 2007). Em relação aos pesticidas, o risco de exposição laboral materna e paterna são semelhantes para o desenvolvimento de FL±P e FP para inseticida, herbicida e fungicida, com exceção para a exposição paterna baixa para todos os tipos de agrotóxicos a qual não foi encontrada significância (Suhl et al., 2018). Alguns estudos afirmam que há maior risco de malformações congênitas como as FONS para gestantes que residem em áreas agrícolas e que estão presentes durante o pico de uso dos pesticidas, porém, é

importante observar que este tipo de estudo apresenta dificuldade de mensuração da exposição ao agente (Garcia, 2000; Chevrier et al., 2006; Yang et al., 2014).

Embora pareça ser um desafio devido à dificuldade de mensuração nos estudos de alguns fatores aqui explorados, outros tipos de exposições ambientais devem continuar a ser avaliados acerca de sua contribuição no desenvolvimento de FONS para que futuramente haja melhor entendimento sobre a patogênese das fissuras orofaciais, possibilitando melhores estratégias preventivas (Dixon et al., 2011).

### **2.3.2 Fatores genéticos**

O mapeamento e manipulação de genes envolvidos na embriogênese craniofacial normal é atualmente a principal estratégia utilizada para o entendimento da etiologia genética das FONS, embora esse mecanismo continue não bem esclarecido (Marazita e Mooney, 2004). Além do fato da etiologia das FONS ser de caráter multifatorial com grande contribuição da interação gene-ambiente, a dificuldade no entendimento do mecanismo genético também está relacionada a característica de padrão de herança não mendeliana (Vieira, 2008).

O padrão não mendeliano pode ser observado principalmente em estudos com gêmeos, em que a taxa de concordância para monozigóticos é de 40 a 60% e para dizigóticos é apenas de 3 a 5% (Jugessur et al., 2009). Quando se trata da hereditariedade das FONS dentro de uma família, foi demonstrado por Curtis et al. (1961) que a possibilidade de uma nova criança ser afetada por FL±PNS é de 4% quando já há um irmão afetado, 9% quando mais de uma criança apresenta a fissura, e 17% quando além de uma criança, os pais também tenham a anomalia. Famílias afetadas geralmente segregam apenas um tipo de fissura orofacial, porém, eventualmente, diferentes tipos de fissuras, como por exemplo as FL±P e FP, podem ocorrer na mesma família, de forma a sugerir a hipótese de que haja sobreposição de genes causadores dessas fissuras (Leslie e Marazita, 2013).

Grande parte dos estudos que buscam elucidar a etiologia genética das FONS utiliza como metodologia a análise de variantes polimórficas em genes e regiões de susceptibilidade às fissuras orofaciais a partir de candidatos que desempenham

funções regulatórias durante o desenvolvimento craniofacial normal (Dixon et al., 2011; Jiang et al., 2006). Podendo-se destacar aqueles que possuem associação com FONS na população brasileira os genes *CRISPLD2* (Mesetti et al., 20116), *GREM1* (Viena et al., 2019), *GRHL3* (Marchi et al., 2020), *MTHFR* (Aquino et al., 2014), *TBX1* (Paranaíba et al., 2013) e a região 8q24 (Souza et al., 2016). E os genes que não apresentaram associação com o desenvolvimento de FONS em população brasileira, incluindo *COL2A1*, *FGFR1*, *MSX1*, *TCOF1*, *TIMP3*, *TNP1* e *WNT3* (Paranaíba et al., 2010; Paranaíba et al., 2013; Machado et al., 2016c). Entretanto, alguns genes apresentam resultados conflitantes em relação à ausência ou presença de associação com FONS em população brasileira, como no caso de *IRF6* e *BMP4* (Brito et al, 2012; Araújo et al., 2012; Antunes et al., 2013; Paranaíba et al., 2013; Borges et al., 2015).

Esse grande número de genes associados ou candidatos no desenvolvimento de FONS está diretamente relacionado a alta complexidade e riqueza de eventos que ocorrem na embriogênese do lábio e palato, e conseqüentemente contribuem na formação de FONS (Jugessur et al., 2009; Rojas-Martinez et al., 2010). Além disso, estes genes são estudados em diferentes populações mundiais, com diferenças étnicas, socioeconômicas e culturais que devem ser consideradas como cofatores nos estudos de doenças complexas e que devido a isso podem acarretar em diferentes resultados ao se avaliar a mesma população de um país (Mossey et al., 2009; Viena et al., 2018). A não validação da ancestralidade leva a uma representação desigual entre os grupos caso e controle, resultando em associações falso-positivas nas análises estatísticas, principalmente na população brasileira (Pereira et al., 2019).

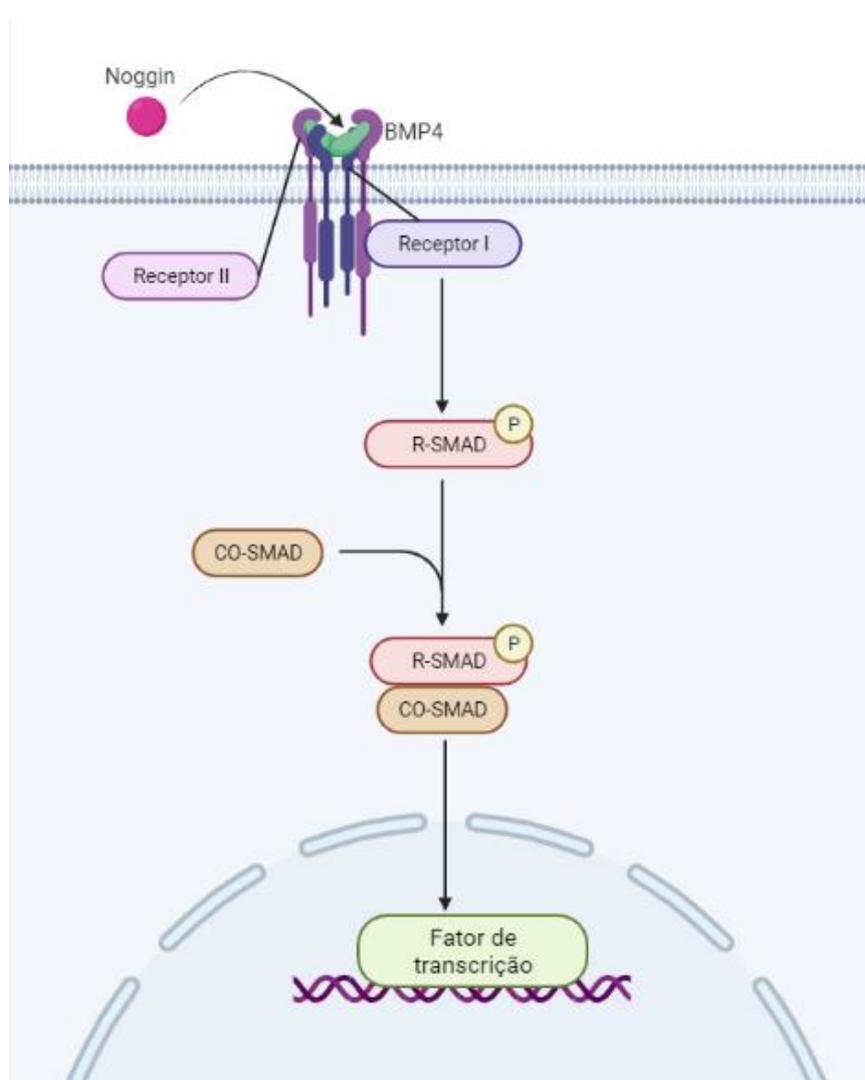
## **2.4 BMP4**

O gene *BMP4* está localizado no cromossomo 14q22-q23 e codifica a proteína BMP4 que juntamente com a proteína BMP2 são os membros mais bem estudados da família BMP, pertencente a superfamília de fatores de crescimento multifuncionais de TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador beta) (Nakayama et al., 2000; Chen et al., 2004). A primeira descrição das BMPs foi no tecido ósseo adulto como um potente indutor de formação de cartilagem e osso, desde então estudos diversos vêm demonstrando que a sinalização das BMPs é ampla, atuando principalmente durante

o desenvolvimento craniofacial, regulando processos embrionários fundamentais como proliferação, diferenciação, apoptose, migração e adesão celular (Chen et al., 2004). É também no desenvolvimento craniofacial que a via de sinalização das BMPs desempenha papel de extrema importância ao coordenar as interações epitélio-mesênquima durante a palatogênese, sendo BMP4 o principal membro da família BMP nesse processo, sendo expresso em todo o epitélio do palato e ectomesênquima, com exceção da região posterior dos processos palatinos (Parada e Chai, 2012). Além de atuar na palatogênese, BMP4 é expresso também no terço médio da face, em regiões onde ocorrem a fusão dos processos faciais durante o desenvolvimento craniofacial (Parada et al., 2012). Foi demonstrado por meio de hibridização *in situ* em embriões de camundongo que Bmp4 pode atuar na marcação de células para apoptose na região que posteriormente irá se fundir, e devido a isso, BMP4 pode ser considerado como essencial na fusão labial adequada (Gong e Guo, 2003).

Além do desenvolvimento craniofacial, o papel de BMP4 durante o desenvolvimento embrionário é essencial para a viabilidade do feto. Foi observado que ao realizar a inativação de Bmp4 em camundongos há pouca ou nenhuma formação do mesoderma, descobrindo assim que BMP4 é essencial para a diferenciação do mesoderma, conseqüentemente não havendo a formação de estruturas derivadas desse folheto e acarretando em morte do embrião ainda durante a gastrulação (Leong e Brickell, 1996). Assim como outros membros da superfamília TFG- $\beta$ , os membros da família BMP se ligam a um complexo receptor transmembrana de estrutura tetrâmera composto por dímeros tipos I e tipo II (BMPRI e BMPRII, respectivamente). BMP4 especificamente se liga ao receptor BMPRII, após a ligação, o receptor tipo II transfosforila o receptor tipo I em um sítio intracelular justamembranar chamado domínio GS, que por sua vez ativa a via Smad (Mothers against decapentaplegic homolog) composta por um conjunto de proteínas de sinalização intracelular. Essa via inicia uma reação em cadeia de fosforilação de receptores R-Smad (Smad regulado por receptor) que se ligam a Co-Smad (Smad de parceiro comum) no meio intracelular, formando um complexo Co-Smad + R-Smad, que migrará para o núcleo celular podendo desempenhar papéis regulatórios de transcrição ou inibição de genes-alvo. Em resposta a ativação da via de sinalização de BMP4, uma série de antagonistas são expressos e atuam tanto no meio

extracelular quanto no intracelular, tais como Nogging e BAMBI (homólogo do inibidor de membrana ligado à membrana de BMP e activina), podendo estes antagonistas atuarem se ligando aos receptores extracelulares de BMP4 ou atuar inibindo a fosforilação dos receptores no meio intracelular (Nakayama *et al.*, 1999; Wan e Cao, 2005) (Figura 2). A via Smad é uma via de sinalização de BMP bem caracterizada. Esta via está presente de forma independente nos eventos de diferenciação de osteoblastos, porém seu efeito apresenta menor efetividade em relação ao induzido por ligantes ou receptores de BMP (Wan e Cao, 2005).



**Figura 2. Resumo da via de sinalização de BMP4.** Após a ligação da proteína BMP4 ao seu receptor, o receptor tipo II (roxo mais claro) fosforila (a fosforilação está representada pela letra P no círculo amarelo) o receptor tipo I (roxo mais escuro) ao qual fosforila o R-Smad permitindo sua ligação com Co-Smad. Unidos, eles se translocam para o núcleo e formam o fator de transcrição (verde) que ativa ou inibe a expressão do gene-alvo. Em resposta a sinalização, no meio extracelular, BMP4 é

regulado por proteínas de ligação ao receptor de BMPs, como Noggin. Esquema gerado no Biorender (<https://biorender.com/>).

#### 2.4.1 *BMP4* e o risco de desenvolvimento de FONS

O desenvolvimento craniofacial é um período delicado da morfogênese, marcado por intensos eventos complexos estritamente regulados por genes que atuam durante os processos de proliferação, apoptose, migração e transição epitélio-mesênquima, eventos esses em que a via de sinalização de *BMP4* faz parte (Mossey et al., 2009; Parada e Chai, 2012). Na embriogênese do lábio e palato, por exemplo, é necessária uma rede de sinalização regulada e a perda da função de proteínas regulatórias de algumas dessas vias, bem como alterações em receptores, pode gerar fenótipos deletérios, e mais especificamente em *BMP4*, acarretar em superexpressão ou inibição (Meng et al., 2009). Alterações na regulação da via *BMP4* já foram estudadas em embriões de camundongo com perda de função da proteína Noggin nas células epiteliais dos processos palatinos, esta é uma proteína chave no bloqueio de *BMP4*, o que ocasionou a formação de FP completa. Essa ausência do bloqueio de *BMP4* realizado pela proteína Noggin leva a sinalização hiperativa de BMPs, acarretando em proliferação celular alterada e morte celular excessiva. Além disso, o mesmo estudo demonstrou que a perda da integridade do epitélio devido a função anormal de *BMP4* compromete a fusão adequada do palato e mandíbula, o que, segundo os autores, pode ter contribuído para a formação da FP (He et al., 2010). Enquanto que o bloqueio condicional do gene *Bmp4* em embriões de camundongos resulta na formação de FL bilateral e a deleção de *Bmp4* gera o fenótipo de FL isolada, e considerando que *Bmp4* é um gene expresso nas zonas laterais do lábio superior, possivelmente a sinalização realizada por ele possa atuar regulando a proliferação e fusão celular durante a morfogênese facial (Lu et al., 2000; Gong e Guo 2003; Liu et al., 2005).

Além dos modelos animais demonstrarem que *Bmp4* é um candidato promissor que pode estar entre os genes já bem conhecidos na formação de FONS, estudos populacionais de associação e meta-análises com *BMP4* vêm confirmando essa relação também em humanos (Li et al., 2017). Porém, a maioria desses estudos se concentra no polimorfismo rs17563 e as conclusões entre eles são conflitantes (Hu et al., 2015; Li et al., 2017; Machado et al., 2018). Na meta-análise realizada por Hu et

al. (2015) foi confirmado que a mudança do nucleotídeo de T para C no SNP rs17563 aumenta o risco para o desenvolvimento de FL±PNS na população chinesa, porém o efeito do alelo T foi protetor em uma população brasileira. A frequência do alelo menor (MAF) do alelo C em rs17563 foi menor em população asiática comparada à população brasileira como descrito na meta-análise realizada por Li et al. (2017). Além disso, o agrupamento de dados de populações asiáticas, brasileira e caucasianas demonstram que não há associação do polimorfismo rs17563 e o desenvolvimento de FL±PNS, porém a estratificação dessa análise de acordo com a etnia da população estudada demonstra que o alelo C em rs17563 pode ser um fator de risco para FL±PNS em populações de etnia asiática e caucasiana, e efeito protetor em população brasileira de etnia miscigenada com origens genéticas não validadas (Li et al., 2017). Entretanto, apesar da associação de proteção de rs17563 em *BMP4* ser confirmada em todas as meta-análises disponíveis, esse efeito não é confiável, pois como observado na meta-análise de Machado et al. (2018), esse resultado baseia-se apenas em dois estudos realizados com população brasileira e os valores de  $Tau^2$  e  $I^2$  revelam alta heterogeneidade.

## **2.5 Interações genéticas na via de sinalização de BMP4 durante o desenvolvimento craniofacial**

Estudos de associação genética focados na identificação de um marcador genético em doenças de etiologia multifatorial têm sido a ferramenta mais utilizada, porém apenas focar em seus efeitos têm apresentado resultados muitas vezes inconclusivos, tendo como potencial causa o mascaramento dos efeitos das interações gene-gene, também chamada epistasia (Chattopadhyay e Lu, 2019). O termo epistasia refere-se ao efeito resultante da interação de um gene com outro gene, que pode se dar tanto pela interação entre genes em um mesmo cromossomo, quanto por genes em cromossomos diferentes e distantes (Chicco e Faultless, 2012). Mutações podem gerar novas interações entre genes ou ainda interromper as interações existentes, de modo a criar mudanças de conformação nos receptores, o que resulta na sua ligação com o ligante, assim como também mudanças na própria proteína ligante, mudando a função dessa proteína e alterando a via de sinalização (Miton et al., 2021). A sinalização exercida pelos membros da família BMP tem papel central na regulação de diversos aspectos do desenvolvimento craniofacial, pois são

potentes fatores de diferenciação de osteoblastos, induzem a diferenciação de células mesenquimatosas multipotentes em células de linhagem osteogênica e condrogênica (Wan e Cao, 2005). Durante o início do desenvolvimento craniofacial de embriões de galinha, as proteínas Bmp4 e Bmp2 controlam o crescimento e padrão facial por meio de uma cascata de sinalização direcionada a ativação do gene *MSX1* (Msh Homeobox 1), que é expresso no epitélio, e do gene *Shh* (Barlow e West, 1997). Enquanto que a inibição BMP4 pela adição de proteína Noggin exógena também nos primórdios da embriogênese facial nesse mesmo modelo animal leva a redução da proliferação e crescimento mesenquimal na região dos processos maxilares, tendo como consequência a não formação dos ossos da maxila e palato primário, com formação de FLP (Ashique et al., 2002).

A glicoproteína Noggin é um fator pleiotrópico expresso pelo gene *NOG* durante todos os estágios do desenvolvimento, sendo considerada um bloqueador clássico das BMPs por se ligar aos receptores tipos I e II de forma concomitante por meio do seu clipe de 20 aminoácidos (Brunet et al., 1998; Krause, 2011). Noggin desempenha papel essencial no desenvolvimento do tubo neural ao ser expresso na face dorsal da placa neural, fazendo a regulação dos processos celulares que farão a elevação e fusão das pregas neurais, evento esse que precede a migração das células do tubo neural para seus destinos finais. Em embriões de camundongo, a inativação de *Nog* leva a ativação prematura de *Msx1* por *Bmp4*, causando aumento da apoptose nas células do dorso do tubo neural (McMahon et al., 1998). A regulação negativa que Noggin exerce sobre as BMPs também é necessária durante a migração das células da crista neural em embriões de galinha, onde o bloqueio é realizado de forma progressiva, diminuindo seu sinal a medida que as células iniciam sua migração (Sela-Donenfeld e Kalcheim, 1999). Durante o desenvolvimento craniofacial, *Nog* é expresso em todo o epitélio oral de embriões de camundongo, e seu bloqueio gera aumento da apoptose por aumento da sinalização de *BMPs* no epitélio palatino, tendo como consequência o fenótipo de FP completa (Matsui e Klingensmith, 2014). Em estudo realizado por He et al. (2010), a FP completa também foi observada após a mutação resultando na perda de função em Noggin no epitélio palatino em desenvolvimento, o que causou aumento da expressão de *BMPs*, levando a apoptose excessiva no epitélio do palato, atraso na elevação dos processos palatinos e consequentemente fusão anormal entre os processos palatinos e maxilares. Embora

*Nog* esteja associado a formação de FP em modelo animal, foi encontrado efeito protetor de polimorfismos em *NOG* no desenvolvimento de FL±PNS em população do norte da China (Song et al., 2014).

Outro gene responsável pela regulação negativa de BMPs é *GREM1* (Gremlin1), que codifica a proteína Gremlin-1 responsável pelo antagonismo nos processos de homeostase, renovação, reparo e regeneração de tecidos ósseos (Gooding e Leedham, 2020). A inibição de *GREM1* em cultura de células tronco mesenquimais humanas aumenta a viabilidade e a diferenciação em células de linhagem osteogênicas induzida pela expressão de *BMP2*, consequentemente aumentando a osteogênese (Hu et al., 2017). No desenvolvimento do lábio e palato de camundongos, *Bmp4* forma uma rede de sinalização dependente de feedbacks negativos de *Pax9* (Paired Box 9) e *GREM1* no crescimento dos processos nasais mediais (Nakatomi et al., 2020). O estudo de caso de Erdogan et al, (2007) revelou que a deleção *de novo* de um trecho de 5,3 Mb na região 15q14 em um probando do sexo feminino causou a formação de FP sindrômica acompanhada de defeitos coronários congênitos e retardo mental. Um estudo de GWAS realizado por Al Chawa et al. (2014) encontrou variantes raras em *GREM1* associadas ao desenvolvimento de FL±PNS, e em estudo com população brasileira, polimorfismos em *GREM1* resultaram em susceptibilidade a FLPNS tanto de maneira isolada quanto interagindo com o polimorfismo rs1880646 em *NTN1* (Viena et a., 2018).

No mesênquima palatino em desenvolvimento de camundongos, a expressão do gene *Msx1* é necessária para a ativação do gene *Bmp4* também no mesênquima, formando uma rede de feedback positivo entre estes genes e autofeedback de *Bmp4*, que atua nos eventos de proliferação do mesênquima palatino e apoptose no epitélio subjacente (Nakatomi et al., 2020). Mutações no gene *MSX1* em humanos estão relacionadas com formação de FP e/ou agenesia dentária (Vastardis et al., 1996; Cobourne, 2007). Em meta-análise realizada por Tasanarong et al. (2019), oito polimorfismos de risco para FL±PNS foram encontrados em *MSX1*, com dois desses SNPs (rs6446693 e rs1907998) apresentando 1,3 vezes maior susceptibilidade. A mesma meta-análise também encontrou associações protetivas para FL±PNS em portadores do SNP rs6832405 e rs1042484 em *MSX1*. Ao realizar uma análise estratificada por etnia, a meta-análise de Gu et al. (2018) encontrou efeito protetivo para o SNP rs12532 em populações caucasiana e asiática, mas sem associação

significativa para populações sul-americanas. Polimorfismos no gene *MSX1* não estão associados a formação de FL±PNS na população brasileira (Machado et al., 2016b). *MSX1* está localizado no cromossomo 4p16 em região adjacente ao locus 4p16.2, que já foi associada como fator de proteção para ocorrência de FLNS em população brasileira (Ide et al., 1996; Machado et al., 2022). O locus 4p16.2 por estar em região próxima a *MSX1* pode apresenta efeitos regulatórios sobre a expressão desse gene (Howard et al., 1997).

A superfamília de genes *FGF* (fator de crescimento fibroblástico) consiste em 22 membros de genes expressos no epitélio e mesênquima oral e que participam de vários eixos de sinalização recíproca com BMPs durante toda a palatogênese (McKeehan et al., 2009; Luukko e Kettunen, 2006). A via de sinalização de *FGF/FGFR* é um fator chave no desenvolvimento craniofacial, regulando processos de migração e morfogênese por meio da ativação de genes alvos específicos (Stanier e Puws, 2012). A deleção de *FGFR1* (receptor do fator de crescimento fibroblástico 1) no mesênquima do palato de embriões de camundongo diminui a proliferação das células do epitélio subjacente que não sofreram deleção *FGFR1* com redução da expressão de BMPs (Wang et al., 2013). Polimorfismos em *FGFR1* já foram associados a ocorrência de FL±PNS em populações do nordeste da Europa (estoniana, letã e lituana), enquanto que SNPs em *FGF1* são fatores de proteção em população iraniana (Nikopensius et al., 2011; Rafiqdoost et al., 2014).

## 2.6 Delineamento experimental

O caráter genético atribuído às FONS vem sendo investigado desde os estudos iniciais realizados por Fogh-Andersen (1942), e desde então diferentes técnicas de mapeamento genético têm sido consideradas no estudo de FONS e vêm obtendo bons resultados: como modelos animais, rearranjos cromossômicos, estudos de ligação, estudos de associação baseados em genes candidatos, sequenciamento de genes candidatos e estudos de GWAS (Raihmov et al., 2012). Dentre as técnicas de estudos genéticos citados, o estudo de associação têm sido um dos mais utilizados, pois é útil na confirmação da hipótese de que um determinado alelo possa estar contribuindo na geração de um determinado fenótipo ou na manifestação de um alelo existente em locus próximo ao locus causal do fenótipo, quando houver desequilíbrio

de ligação (Feitosa e Krieger, 2002). Ou seja, o estudo de associação fará a associação ou não do alelo estudado e o fenótipo da doença, e é dividido em três grandes categorias. (1) O teste de caso-controle utiliza indivíduos que apresentam o fenótipo da doença (casos) e indivíduos que não apresentam (controle). Este teste compara, por meio de pareamento, a frequência de alelo ou genótipo no grupo caso com a frequência no grupo controle. (2) Testes de associação em núcleo familiar, que utiliza indivíduos que apresentam o fenótipo da doença e seus parentes, comparando a frequência alélica dos indivíduos afetados a de seus parentes os quais serão o controle, geralmente pais ou irmão que não apresentem o fenótipo. (3) E por último, os testes de associação com características quantitativas, que faz a correlação entre os valores de medidas contínuas (como peso e altura) e os genótipos, podendo este tipo de teste ser utilizado para estudos caso-controle ou de núcleo familiar (Martin e Chung, 2021).

Os estudos de caso-controle costumam ser largamente utilizados por apresentarem a vantagem de recrutamento de um grande número de indivíduos que apresentam o fenótipo (grupo caso) e o grupo controle, formado por indivíduos que não apresentam o fenótipo estudado (Risch, 2000). Entretanto, devido a sua característica retrospectiva, os estudos caso-controle podem ser passíveis de vies, como o vies de amostragem, pois a população utilizada pode não ser representativa da população analisada, sendo necessário que o pesquisador esteja ciente dos riscos e busque formas de minimizá-los (Dupépe e Gordon, 2019). Levando-se em consideração que o vies de amostragem pode ser causado pela miscigenação da população estudada, e visto que a população brasileira exibe alto nível de diversidade genômica devido a mistura de 3 principais populações ancestrais (Europeia, Africana e Ameríndia), para evitar esse vies, utiliza-se marcadores polimórficos que analisam a variedade genética da ascendência de cada indivíduo (Letra et al., 2007; Pena et al., 2009; Aquino et al., 2014). Essa antecipação ao vies também deve ser considerada para o delineamento do estudo de associação, pois o efeito do risco da doença causado por um polimorfismo pode ser confundido pelo fenômeno de epistasia (interação gene-gene) em doenças complexas (Chattopadhyay e Lu, 2019).

### 3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a influência dos tag-SNPs rs11623717, rs17563, rs2071047, rs2761887 e rs4898820 em *BMP4* no risco de desenvolvimento das FL±PNS na população brasileira, além de analisar as interações entre os tag-SNPs em *BMP4* com genes *FGFR1*, *GREM1*, *NOG*, *VAX1* e o locus 4p16.2, descritos como participantes na via de sinalização de *BMP4*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Comitê de Ética em Pesquisa**

Este estudo caso-controle está inserido em um projeto multicêntrico, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas e de todos os Comitês de Ética dos centros coparticipantes (Plataforma Brasil, CAAE 08452819.0.0000.5418).

### **4.2 Pacientes**

As amostras de 800 pacientes com FL±PNS (232 de FLNS e 568 de FLPNS) e 881 indivíduos controle foram utilizadas neste estudo. Os pacientes foram selecionados de 5 centros de atendimento à pacientes com fissuras orofaciais: Associação de Portadores de Fissura Lábio-Palatal e o Centro de Atenção e Pesquisa em Anomalias Crâniofaciais-CEPAC vinculados à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel-PR, o Centro de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de Alfenas (UNIFENAS), Alfenas-MG, o Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Lábio Palatal, Curitiba-PR, e o Centrinho do Hospital Santo Antônio das Obras Sociais Irmã Dulce, Salvador-BA. Os pacientes atendidos nestes centros são examinados por equipes multidisciplinares para exclusão dos que apresentam características de síndromes. As amostras do grupo controle foram obtidas das mesmas regiões geográficas, de indivíduos saudáveis sem distúrbios físicos e psiquiátricos, deformidades de nascimento ou histórico familiar de fissuras orofaciais.

### **4.3 Amostras de DNA**

O DNA foi isolado de células da mucosa oral obtidas por bochecho com uma solução de sacarose a 3% ou por raspagem da mucosa oral com uma espátula em casos de crianças onde o bochecho não pode ser aplicado. O isolamento do DNA foi processado segundo método de (Aidar e Line 2007), com algumas pequenas alterações. As células da mucosa oral foram incubadas com 10 µg de proteinase K em tampão contendo 10 mM Tris pH 8,0, 0,5% SDS e 5 mM EDTA por 16 h a 55°C. Ao fim da incubação, o DNA foi purificado, removendo-se proteínas e outros

contaminantes com uma solução aquosa contendo 7,5 M de acetato de amônio e 1 mM de EDTA e centrifugação a 14000xg por 10 min. O DNA foi precipitado, ressuspendido e quantificado por espectrofotometria.

#### 4.4 Seleção dos Tag-SNPs

A região genômica contendo 5 kb upstream e 2 kb downstream de *BMP4* foi rastreada para tag-SNPs (<https://snpinf.niehs.nih.gov/snpinf/snptag.html>). A captura dos tag-SNPs foi realizada com os dados do Projeto 1000 Genomes, seguindo os critérios de frequência do alelo menor  $>0,1$ , valor de P em equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE)  $>0,05$  e limite de desequilíbrio de ligação ( $r^2$ )  $>0,8$ . Aplicando este filtro rigoroso, 5 SNPs foram selecionados. As principais características de cada SNP, incluindo localização no gene, identificação dos alelos maiores e menores, frequência do alelo menor (MAF) são descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) do gene *BMP4*.

SNP	Localização	Alelo	MAF Controle	Call rate	HWE
rs11623717	chr14:53947414	A/G	40,1%	98,5%	0,384
rs17563	chr14:53950804	A/G	39,2%	99,2%	0,105
rs2071047	chr14:53951693	G/A	43,4%	98,5%	0,785
rs2761887	chr14:53958334	C/A	39,6%	99,2%	0,517
rs4898820*	chr14:53960339	G/T	23,6%	98,5%	0,004

HWE: sigla para Equilíbrio de Hardy-Weinberg do inglês “Hardy-Weinberg Equilibrium”; MAF: sigla para frequência do alelo menor do inglês “Minor allele frequency” (alelos menores estão em negrito); Call rate: taxa de chamada.

#### 4.5 Genotipagem e Avaliação da ancestralidade genômica

As reações de genotipagem foram realizadas utilizando o sistema de discriminação alélica com sondas fluorescentes (sistema TaqMan® da Applied Biosystems, EUA) no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems, EUA). O volume total das reações foi de 5 µl contendo 2,5 µl de Genotyping Master Mix, 0,12

μl de uma mistura de primers e sondas e 2,38 μl de DNA (5 ng). Os parâmetros de amplificação utilizados foram: 1 ciclo de 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).

Para determinar a ancestralidade genômica, cada amostra foi genotipada individualmente com um painel de 40 polimorfismos bialélicos de inserção-deleção curta (INDEL) que foram previamente validados como marcadores informativos de ancestralidade na população brasileira (Bastos-Rodrigues et al., 2011), como previamente descrito por Messetti et al. (2017). Com o auxílio do software Structure versão 2.3.4 (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000) e amostras de populações de origem pré-especificadas (populações de referência ameríndias, europeias e da África Subsaariana da Marshfield Clinic Collection), a estimativa da proporção de ancestralidade de cada amostra foi determinada.

#### **4.6 Análise de interação SNP-SNP**

Para a análise de interações SNP-SNP, os polimorfismos previamente analisados pelo nosso grupo de pesquisa, incluindo rs7078160 no gene *VAX1* (ventral anterior homeobox 1) (Rego Borges et al., 2015), rs227731 no gene *NOG* (de Aquino et al. 2014), rs13317 e rs7829058 no gene *FGFR1* (Machado et al. 2016; 2022), rs16969862 e rs16969816 no gene *GREM1* (Gremlin-1) (Viena et al. 2019), rs1907989 (dados não publicados) e rs34246903 no locus 4p16.2 (Machado et al. 2022), foram selecionados por estarem localizados em genes conhecidos por interagirem com *BMP4*, como revelado pelo STRING (<http://string-db.org>).

#### **4.7 Análise estatística**

A existência de HWE nas amostras do grupo controle foi calculada por meio do teste qui-quadrado. Para verificar a existência de diferença entre os grupos para sexo foi utilizado o teste qui-quadrado e para as proporções de ancestralidade, o teste de Mann-Whitney foi aplicado. A análise de regressão logística múltipla sob modelos genéticos aditivos, dominantes e recessivos, atentando-se para ancestralidade genômica e sexo como possíveis covariáveis foi efetuada pelo programa Rstudio, com o pacote SNPAssoc. A análise de haplótipos dos polimorfismos em *BMP4* foi realizada

no software Rstudio, com o pacote Haplo.stats. Para análise de interação gênica, foi utilizado o pacote mbmdr em R, seguido por testes de permutação (n=1000 permutações) para eliminar interações falso-positivas. O poder da amostra foi calculado usando o programa Quanto, tendo como base os ORs mais conservadores relatados na literatura para todos os SNPs. A significância estatística após correção de Bonferroni para múltiplas correções foi definida como  $<0,0125$ .

## 5 RESULTADOS

Neste estudo, todos os polimorfismos respeitaram o HWE, com exceção de rs4898820 que foi excluído das demais análises (Tabela 1). O sucesso de genotipagem (call rate) ficou entre 98,5% e 99,2% (Tabela 1) e as reações foram repetidas em 5% das amostras para cada tag-SNP, com uma taxa de concordância de 100%.

A genotipagem dos polimorfismos genéticos em *BMP4* foi realizada em 881 indivíduos controles e 800 pacientes com FL±PNS (232 FLNS e 568 FLPNS) (Tabela 2). O sexo masculino foi significativamente mais comum nos grupos FL±PNS (56,3%) e FLPNS (57,4%) do que no grupo controle (47,8%). Embora mais frequente no grupo de FLNS (53,6%), a frequência no sexo masculino não atingiu um patamar estatístico quando comparado ao grupo controle. Em termos de proporção de ancestralidade, os grupos não foram substancialmente diferentes, como pode ser visto na tabela 2. A ancestralidade europeia foi a mais comum, seguida pela ancestralidade africana e ameríndia.

**Tabela 2.** Distribuição por sexo e proporções de ancestralidade entre os grupos de pacientes incluídos no estudo.

	Controle (n=881)	FL±PNS (n=800)	FLNS (n=232)	FLPNS (n=568)
<b>Sexo</b>				
Masculino	421 (47,8%)	450 (56,3%)*	124 (53,5%)	326 (57,4%)*
Feminino	460 (52,2%)	350 (43,7%)	108 (46,5%)	242 (42,6%)
<b>Ancestralidade</b>				
Europeia	83,4%	82,7%	82,4%	82,7%
Africana	14,8%	15,4%	15,9%	15,3%
Ameríndia	1,8%	1,9%	1,7%	2,0%

FL±PNS: Fissura labial com ou sem fissura palatina não síndrômica; FLNS: Fissura labial não síndrômica; FLPNS: Fissura de lábio e palato não síndrômica.

\*Estatisticamente diferente do controle no valor de  $p < 0,0005$ .

Para avaliar a associação dos tag-SNPs com a suscetibilidade às FL±PNS, a distribuição alélica e os modelos genéticos aditivos, dominantes e recessivos foram utilizados. Nestes modelos, o peso de cada genótipo varia. Por exemplo, no modelo aditivo este peso é independente (homozigoto do alelo principal, heterozigoto e homozigoto do alelo menor), enquanto que no modelo dominante, o efeito dos homozigotos do alelo principal é comparado com o efeito de combinação de heterozigotos e homozigotos do alelo menor e no modelo recessivo, o efeito de combinação dos homozigotos do alelo principal e dos heterozigotos é comparado com os homozigotos do alelo menor. Em todas estas análises, não houve associações estatisticamente significantes entre os SNPs e o risco para FL±PNS ou isoladamente para FLNS e FLPNS (Tabelas 3, 4 e 5).

**Tabela 3.** Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FL±PNS). Os valores de p foram ajustados para covariáveis por análise de regressão logística.

	Controle (%)	FL±PNS (%)	OR <sub>alelo</sub> (95% IC)	OR <sub>Het</sub> (95% IC)	OR <sub>Hom</sub> (95% IC)	OR <sub>Dom</sub> (95% IC)	OR <sub>Rec</sub> (95% IC)
			Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p
rs11623717 (AA/AG/GG)	36,6/46,6/16,8	39,1/44,5/16,4	0,96 (0,85-1,09)	0,88 (0,71-1,09)	0,90 (0,68-1,20)	0,89 (0,73-1,08)	0,97 (0,74-1,26)
			0,58	0,25	0,67	0,24	0,80
rs17563 (AA/AG/GG)	38,2/45,1/16,7	38,0/43,1/18,9	1,03 (0,90-1,17)	0,95 (0,77-1,18)	1,15 (0,87-1,52)	1,00 (0,82-1,23)	1,18 (0,91-1,52)
			0,67	0,64	0,31	0,96	0,20
rs2071047 (GG/GA/AA)	31,7/49,6/18,6	35,9/44,7/19,4	0,96 (0,85-1,09)	0,78 (0,63-0,97)	0,91 (0,69-1,20)	0,82 (0,66-1,00)	1,05 (0,82-1,34)
			0,53	0,02	0,56	0,05	0,71
rs2761887 (CC/CA/AA)	36,9/46,8/16,3	35,7/44,7/19,6	1,05 (0,93-1,19)	1,00 (0,81-1,24)	1,24 (0,94-1,65)	1,07 (0,87-1,30)	1,24 (0,97-1,60)
			0,46	0,97	0,14	0,53	0,09

OR<sub>alelo</sub>: Odds Ratio alelo; OR<sub>Het</sub>: Odds Ratio heterozigoto; OR<sub>Hom</sub>: Odds Ratio homozigoto; OR<sub>Dom</sub>: Odds Ratio dominante; OR<sub>Rec</sub>: Odds Ratio recessivo; IC: intervalo de confiança.

**Tabela 4.** Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio não-sindrômica (FLNS). Os valores de p foram ajustados para covariáveis por análise de regressão logística.

	Controle (%)	FLNS (%)	OR <sub>alelo</sub> (95% IC)	OR <sub>Het</sub> (95% IC)	OR <sub>Hom</sub> (95% IC)	OR <sub>Dom</sub> (95% IC)	OR <sub>Rec</sub> (95% IC)
			Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p
rs11623717 (AA/AG/GG)	36,6/46,6/16,8	40,5/45,3/14,2	0,91 (0,75-1,11)	0,89 (0,65-1,22)	0,77 (0,49-1,21)	0,86 (0,64-1,16)	0,82 (0,54-1,25)
			0,38	0,47	0,37	0,31	0,34
rs17563 (AA/AG/GG)	38,2/45,1/16,7	33,9/47,9/18,2	1,07 (0,89-1,29)	1,20 (0,87-1,66)	1,21 (0,79-1,86)	1,21 (0,89-1,64)	1,09 (0,74-1,60)
			0,48	0,25	0,37	0,22	0,65
rs2071047 (GG/GA/AA)	31,7/49,6/18,6	35,5/48,7/15,8	0,92 (0,76-1,18)	0,88 (0,63-1,22)	0,76 (0,49-1,19)	0,85 (0,62-1,15)	0,82 (0,55-1,23)
			0,41	0,43	0,24	0,29	0,33
rs2761887 (CC/CA/AA)	36,9/46,8/16,3	36,8/44,2/19,0	1,04 (0,86-1,25)	0,96 (0,70-1,33)	1,19 (0,79-1,81)	1,02 (0,76-1,38)	1,22 (0,84-1,77)
			0,70	0,86	0,40	0,88	0,30

OR<sub>alelo</sub>: Odds Ratio alelo; OR<sub>Het</sub>: Odds Ratio heterozigoto; OR<sub>Hom</sub>: Odds Ratio homozigoto; OR<sub>Dom</sub>: Odds Ratio dominante; OR<sub>Rec</sub>: Odds Ratio recessivo; IC: intervalo de confiança.

**Tabela 5.** Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio e palato não-sindrômica (FLPNS). Os valores de p foram ajustados para covariáveis por análise de regressão logística.

	Controle (%)	FLPNS (%)	OR <sub>alelo</sub> (95% IC)	OR <sub>Het</sub> (95% IC)	OR <sub>Hom</sub> (95% IC)	OR <sub>Dom</sub> (95% IC)	OR <sub>Rec</sub> (95% IC)
			Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p
rs11623717 (AA/AG/GG)	36,6/46,6/16,8	38,3/44,2/17,5	0,98 (0,85-1,13)	0,89 (0,70-1,12)	0,97 (0,71-1,32)	0,91 (0,73-1,13)	1,03 (0,78-1,38)
			0,84	0,34	0,98	0,39	0,82
rs17563 (AA/AG/GG)	38,2/45,1/16,7	39,8/41,0/19,3	1,01 (0,87-1,16)	0,87 (0,68-1,10)	1,13 (0,83-1,53)	0,94 (0,75-1,16)	1,22 (0,92-1,61)
			0,89	0,22	0,43	0,55	0,17
rs2071047 (GG/GA/AA)	31,7/49,6/18,6	36,0/43,0/21,0	0,98 (0,85-1,12)	0,74 (0,58-0,95)	0,97 (0,72-1,31)	0,81 (0,64-1,01)	1,15 (0,88-1,51)
			0,74	0,02	0,92	0,63	0,29
rs2761887 (CC/CA/AA)	36,9/46,8/16,3	35,2/44,9/19,9	1,07 (0,93-1,23)	1,02 (0,81-1,30)	1,26 (0,93-1,72)	1,09 (0,87-1,36)	1,25 (0,95-1,64)
			0,36	0,84	0,13	0,46	0,12

OR<sub>alelo</sub>: Odds Ratio alelo; OR<sub>Het</sub>: Odds Ratio heterozigoto; OR<sub>Hom</sub>: Odds Ratio homozigoto; OR<sub>Dom</sub>: Odds Ratio dominante; OR<sub>Rec</sub>: Odds Ratio recessivo; IC: intervalo de confiança.

Para explorar os resultados de acordo com a ancestralidade, a amostra foi dividida com base na porcentagem de ancestralidade europeia e africana. Para o enriquecimento com ancestralidade africana, indivíduos foram agrupados tomando como referência 20% (>20%, representando o grupo com enriquecimento, e <20%), sendo que 20% é a média de ancestralidade africana encontrada na população brasileira (Pena *et al.*, 2011). Enquanto nenhuma associação significativa para a amostra enriquecida com ancestralidade europeia foi identificada (Tabela 6), associações significantes com o polimorfismo rs2761887 foi identificado na amostra com enriquecimento africano. A frequência do genótipo AA foi significativamente maior no grupo FL±PNS em comparação ao grupo controle (21,9% e 18,2%, respectivamente), gerando um  $OR_{hom}$  de 2,16 (IC 95%: 1,21-3,85,  $p=0,01$ ) (Tabela 6). Utilizando o modelo genético recessivo (CC+CA vs. AA), a chance de ocorrência de FL±PNS foi de 2,05 (IC 95%: 1,21-3,47,  $p=0,006$ ) (Tabela 7). A análise estratificada por FLNS e FLPNS dos grupos com enriquecimento europeu ou com enriquecimento africano, não apresentou resultados significativos (Tabelas 8, 9, 10 e 11), talvez devido à redução no poder da amostra. Exemplo disso são os valores de  $p$  para os modelos recessivo e heterozigoto na amostra com alta ancestralidade africana que quando separado os tipos de fissura, observamos uma tendência a significância nestes dois modelos para a FLPNS.

As análises da associação de haplótipos com susceptibilidade para FL±PNS foram realizadas com a combinação de 2, 3 e 4 SNPs em *BMP4*, porém não foram encontradas associações estatisticamente significantes (Tabela 12).

**Tabela 6.** Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FL±PNS) com baixa ancestralidade africana. Os valores de p foram ajustados para covariáveis por análise de regressão logística.

	Controle (%)	FL±PNS (%)	OR <sub>alelo</sub> (95% IC)	OR <sub>Het</sub> (95% IC)	OR <sub>Hom</sub> (95% IC)	OR <sub>Dom</sub> (95% IC)	OR <sub>Rec</sub> (95% IC)
			Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p
rs11623717 (AA/AG/GG)	36,9/42,9/20,2	35,9/47,1/17,0	0,97 (0,82-1,14)	1,11 (0,84-1,46)	0,86 (0,60-1,22)	1,03 (0,79-1,33)	0,81 (0,59-1,12)
			0,74	0,46	0,40	0,83	0,19
rs17563 (AA/AG/GG)	38,9/44,1/17,0	37,1/43,5/19,4	1,05 (0,89-1,24)	1,02 (0,78-1,35)	1,18 (0,83-1,68)	1,07 (0,83-1,38)	1,16 (0,84-1,61)
			0,52	0,86	0,31	0,62	0,36
rs2071047 (GG/GA/AA)	31,9/47,6/20,5	33,2/45,3/21,5	0,99 (0,85-1,17)	0,89 (0,67-1,19)	1,01 (0,71-1,43)	0,93 (0,71-1,21)	1,08 (0,79-1,46)
			0,98	0,98	0,98	0,56	0,63
rs2761887 (CC/CA/AA)	36,2/45,6/18,2	36,3/47,5/16,2	0,97 (0,82-1,14)	1,04 (0,79-1,37)	0,87 (0,60-1,25)	0,99 (0,77-1,29)	0,85 (0,61-1,18)
			0,75	0,42	0,42	0,95	0,33

OR<sub>alelo</sub>: Odds Ratio alelo; OR<sub>Het</sub>: Odds Ratio heterozigoto; OR<sub>Hom</sub>: Odds Ratio homozigoto; OR<sub>Dom</sub>: Odds Ratio dominante; OR<sub>Rec</sub>: Odds Ratio recessivo; IC: intervalo de confiança.

**Tabela 7.** Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FL±PNS) com alta ancestralidade africana. Os valores de p foram ajustados para covariáveis por análise de regressão logística.

	Controle (%)	FL±PNS (%)	OR <sub>alelo</sub> (95% IC)	OR <sub>Het</sub> (95% IC)	OR <sub>Hom</sub> (95% IC)	OR <sub>Dom</sub> (95% IC)	OR <sub>Rec</sub> (95% IC)
			Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p
rs11623717 (AA/AG/GG)	36,9/42,9/20,2	40,8/45,6/13,7	1,01 (0,78-1,31)	0,80 (0,53-1,20)	1,34 (0,70-2,57)	0,88 (0,60-1,30)	1,52 (0,83-2,79)
			0,92	0,21	0,33	0,52	0,17
rs17563 (AA/AG/GG)	38,9/44,1/17,0	42,5/43,0/14,5	0,89 (0,69-1,16)	0,78 (0,51-1,18)	0,79 (0,44-1,40)	0,78 (0,53-1,15)	0,90 (0,53-1,54)
			0,41	0,22	0,71	0,21	0,71
rs2071047 (GG/GA/AA)	31,9/47,6/20,5	36,2/47,3/16,5	0,97 (0,75-1,24)	0,76 (0,50-1,16)	0,99 (0,55-1,78)	0,81 (0,54-1,21)	1,17 (0,69-1,98)
			0,80	0,12	0,93	0,30	0,56
rs2761887 (CC/CA/AA)	36,2/45,6/18,2	33,0/45,1/21,9	1,21 (0,94-1,56)	1,10 (0,72-1,67)	2,16 (1,21-3,85)	1,30 (0,88-1,94)	2,05 (1,21-3,47)
			0,13	0,55	<b>0,01</b>	0,19	<b>0,006</b>

OR<sub>alelo</sub>: Odds Ratio alelo; OR<sub>Het</sub>: Odds Ratio heterozigoto; OR<sub>Hom</sub>: Odds Ratio homozigoto; OR<sub>Dom</sub>: Odds Ratio dominante; OR<sub>Rec</sub>: Odds Ratio recessivo; IC: intervalo de confiança.

Em negrito valores de p significantes após ajuste com correção de Bonferroni para múltiplos testes ( $p \leq 0,0125$ ).

**Tabela 8.** Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FLNS) com baixa ancestralidade africana. Os valores de p foram ajustados para covariáveis por análise de regressão logística.

	Controle (%)	FLNS (%)	OR <sub>alelo</sub> (95% IC)	OR <sub>Het</sub> (95% IC)	OR <sub>Hom</sub> (95% IC)	OR <sub>Dom</sub> (95% IC)	OR <sub>Rec</sub> (95% IC)
			Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p
rs11623717 (AA/AG/GG)	36,2/44,5/19,3	39,6/47,9/12,5	0,87 (0,69-1,04)	1,00 (0,69-1,44)	0,61 (0,35-1,04)	0,88 (0,62-1,25)	0,61 (0,37-1,01)
			0,26	0,13	0,30	0,48	0,04
rs17563 (AA/AG/GG)	38,9/44,3/16,8	30,9/47,9/21,2	1,15, (0,93-1,43)	1,35 (0,92-1,98)	1,51 (0,93-2,45)	1,39 (0,97-2,00)	1,27 (0,83-1,95)
			0,19	0,17	1,04	0,06	0,27
rs2071047 (GG/GA/AA)	31,7/48,2/20,1	34,7/49,7/15,6	0,91 (0,73-1,14)	0,95 (0,65-1,39)	0,72 (0,43-1,20)	0,88 (0,61-1,26)	0,74 (0,47-1,17)
			0,43	0,40	0,08	0,48	0,19
rs2761887 (CC/CA/AA)	36,3/46,1/17,6	38,2/43,5/18,3	0,98 (0,78-1,23)	0,91 (0,63-1,33)	0,99 (0,61-1,61)	0,94 (0,66-1,33)	1,04 (0,67-1,61)
			0,88	0,88	0,61	0,70	0,86

OR<sub>alelo</sub>: Odds Ratio alelo; OR<sub>Het</sub>: Odds Ratio heterozigoto; OR<sub>Hom</sub>: Odds Ratio homozigoto; OR<sub>Dom</sub>: Odds Ratio dominante; OR<sub>Rec</sub>: Odds Ratio recessivo; IC: intervalo de confiança.

**Tabela 9.** Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FLNS) com alta ancestralidade africana. Os valores de p foram ajustados para covariáveis por análise de regressão logística.

	Controle (%)	FLNS (%)	OR <sub>alelo</sub> (95% IC)	OR <sub>Het</sub> (95% IC)	OR <sub>Hom</sub> (95% IC)	OR <sub>Dom</sub> (95% IC)	OR <sub>Rec</sub> (95% IC)
			Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p
rs11623717 (AA/AG/GG)	36,9/42,9/20,2	35,9/47,1/17,0	1,04 (0,70-1,54)	0,60 (0,32-1,14)	1,74 (0,73-4,14)	0,77 (0,43-1,38)	2,26 (1,00-5,09)
			0,82	0,04	0,72	0,38	0,05
rs17563 (AA/AG/GG)	38,9/44,1/17,0	37,1/43,5/19,4	0,84 (0,57-1,25)	0,90 (0,49-1,64)	0,60 (0,22-1,63)	0,83 (0,47-1,49)	0,64 (0,25-1,64)
			0,40	0,58	0,08	0,53	0,33
rs2071047 (GG/GA/AA)	31,9/47,6/20,5	33,2/45,3/21,5	0,95 (0,65-1,38)	0,67 (0,36-1,27)	0,94 (0,40-2,22)	0,73 (0,49-1,33)	1,18 (0,54 -2,59)
			0,79	0,44	0,40	0,30	0,67
rs2761887 (CC/CA/AA)	36,2/45,6/18,2	36,3/47,5/16,2	1,20 (0,83-1,74)	1,15 (0,60-2,19)	2,02 (0,88-4,64)	1,33 (0,73-2,44)	1,87 (0,89-3,93)
			0,31	0,24	0,76	0,34	0,10

OR<sub>alelo</sub>: Odds Ratio alelo; OR<sub>Het</sub>: Odds Ratio heterozigoto; OR<sub>Hom</sub>: Odds Ratio homozigoto; OR<sub>Dom</sub>: Odds Ratio dominante; OR<sub>Rec</sub>: Odds Ratio recessivo; IC: intervalo de confiança.

**Tabela 10.** Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FLPNS) com baixa ancestralidade africana. Os valores de p foram ajustados para covariáveis por análise de regressão logística.

	Controle (%)	FLPNS (%)	OR <sub>alelo</sub> (95% IC)	OR <sub>Het</sub> (95% IC)	OR <sub>Hom</sub> (95% IC)	OR <sub>Dom</sub> (95% IC)	OR <sub>Rec</sub> (95% IC)
			Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p
rs11623717 (AA/AG/GG)	36,9/42,9/20,2	35,9/47,1/17,0	0,98 (0,83-1,15)	0,90 (0,68-1,19)	0,95 (0,67-1,35)	0,91 (0,71-1,18)	1,01 (0,74-1,38)
			0,83	0,75	0,13	0,49	0,95
rs17563 (AA/AG/GG)	38,9/44,1/17,0	37,1/43,5/19,4	1,04 (0,88-1,22)	0,92 (0,70-1,21)	1,20 (0,84-1,20)	1,00 (0,77-1,29)	1,25 (0,91-1,72)
			0,62	0,32	0,73	0,97	0,16
rs2071047 (GG/GA/AA)	31,9/47,6/20,5	33,2/45,3/21,5	0,97 (0,83-1,14)	0,73 (0,55-0,97)	0,96 (0,68-1,35)	0,80 (0,61-1,04)	1,15 (0,85-1,55)
			0,78	0,06	0,70	0,09	0,36
rs2761887 (CC/CA/AA)	36,2/45,6/18,2	36,3/47,5/16,2	1,02 (0,87-1,20)	0,99 (0,75-1,31)	1,08 (0,76-1,54)	1,02 (0,78-1,31)	1,08 (0,79-1,49)
			0,79	0,88	0,15	0,90	0,61

OR<sub>alelo</sub>: Odds Ratio alelo; OR<sub>Het</sub>: Odds Ratio heterozigoto; OR<sub>Hom</sub>: Odds Ratio homozigoto; OR<sub>Dom</sub>: Odds Ratio dominante; OR<sub>Rec</sub>: Odds Ratio recessivo; IC: intervalo de confiança.

**Tabela 11.** Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em pacientes com fissura de lábio com ou sem fissura palatina não-sindrômica (FLPNS) com alta ancestralidade africana. Os valores de p foram ajustados para covariáveis por análise de regressão logística.

	Controle (%)	FLPNS (%)	OR <sub>alelo</sub> (95% IC)	OR <sub>Het</sub> (95% IC)	OR <sub>Hom</sub> (95% IC)	OR <sub>Dom</sub> (95% IC)	OR <sub>Rec</sub> (95% IC)
			Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p	Valor de p
rs11623717 (AA/AG/GG)	36,9/42,9/20,2	35,9/47,1/17,0	1,00 (0,75-1,33)	0,82 (0,52-1,29)	1,07 (0,51-2,26)	0,86 (0,55-1,33)	1,20 (0,60-2,42)
			0,99	0,60	0,51	0,49	0,60
rs17563 (AA/AG/GG)	38,9/44,1/17,0	37,1/43,5/19,4	0,92 (0,68-1,22)	0,74 (0,46-1,18)	1,06 (0,56-2,01)	0,81 (0,52-1,25)	1,25 (0,69-2,26)
			0,56	0,33	0,52	0,33	0,45
rs2071047 (GG/GA/AA)	31,9/47,6/20,5	33,2/45,3/21,5	0,97 (0,74-1,28)	0,72 (0,45-1,16)	0,95 (0,49-1,84)	0,77 (0,49-1,21)	1,17 (0,65-2,11)
			0,86	0,34	0,91	0,25	0,61
rs2761887 (CC/CA/AA)	36,2/45,6/18,2	36,3/47,5/16,2	1,21 (0,92-1,59)	1,15 (0,71-1,86)	2,22 (1,17-4,21)	1,36 (0,87-2,14)	2,05 (1,15-3,64)
			0,16	0,04	0,19	0,17	0,01

OR<sub>alelo</sub>: Odds Ratio alelo; OR<sub>Het</sub>: Odds Ratio heterozigoto; OR<sub>Hom</sub>: Odds Ratio homozigoto; OR<sub>Dom</sub>: Odds Ratio dominante; OR<sub>Rec</sub>: Odds Ratio recessivo; IC: intervalo de confiança.

**Tabela 12.** Análises de haplótipos dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene *BMP4* no estudo caso-controle de FL±PNS.

**a) Dois SNPs**

SNPs	Haplótipo	Controle	FL±PNS	OR (95% IC)	Valor de <i>p</i>
rs11623717 e rs17563	A-G	36,6%	37,6%	-	-
	G-A	37,5%	35,9%	0,93 (0,80-1,09)	0,36
	A-A	23,2%	23,6%	0,99 (0,83-1,18)	0,83
	G-G	2,7%	2,9%	1,06 (0,67-1,67)	0,74
rs11623717 e rs2071047	A-G	53,7%	54,0%	-	-
	G-A	37,1%	34,4%	0,96 (0,79-1,06)	0,13
	A-A	6,2%	7,5%	1,17 (0,89-1,53)	0,20
	G-G	2,8%	3,9%	1,30 (0,90-1,89)	0,14
rs11623717 e rs2761887	A-C	34,7%	36,4%	-	-
	G-A	35,0%	33,5%	0,90 (0,77-1,06)	0,34
	A-A	25,3%	24,5%	0,91 (0,76-1,10)	0,60
	G-C	4,9%	5,2%	0,98 (0,68-1,40)	0,75
rs17563 e rs2071047	A-A	42,7%	39,9%	-	-
	G-G	38,5%	38,6%	1,06 (0,91-1,23)	0,88
	A-G	17,9%	19,6%	1,14 (0,95-1,37)	0,34
	G-A	0,6%	1,9%	2,4 (1,21-4,79)	0,13
rs17563 e rs2761887	A-A	45,3%	43,3%	-	-
	G-C	24,4%	25,6%	1,09 (0,93-1,29)	0,37
	A-C	15,3%	16,3%	1,10 (0,89-1,36)	0,46
	G-A	15,0%	14,8%	1,03 (0,82-1,28)	0,82

rs2071047 e rs2761887	A-A	37,8%	36,3%	-	-
	G-C	34,0%	36,6%	1,11 (0,95-1,29)	0,14
	G-A	22,5%	21,6%	1,00 (0,82-1,21)	0,58
	A-C	5,6%	5,4%	1,01 (0,71-1,44)	0,97

**a) b) Três SNPs**

SNPs	Haplótipo	Controle	FL±PNS	OR (95% IC)	p
rs11623717, rs17563 e rs2071047	A-G-G	36,5%	36,3%	-	-
	G-A-A	36,6%	33,7%	0,93 (0,97-1,09)	0,10
	A-A-G	17,2%	17,7%	1,03 (0,85-1,24)	0,72
	A-A-A	6,0%	6,3%	1,03 (0,77-1,39)	0,72
	G-G-G	2,0%	2,3%	1,03 (0,61-1,73)	0,55
	G-A-G	0,8%	1,8%	1,81 (0,92-3,57)	0,06
rs11623717, rs17563 e rs2761887	G-A-A	33,5%	31,9%	-	-
	A-G-C	23,5%	24,7%	1,10 (0,91-1,32)	0,38
	A-G-A	13,2%	12,9%	1,02 (0,80-1,29)	0,77
	A-A-A	11,9%	11,5%	1,01 (0,79-1,29)	0,67
	A-A-C	11,3%	12,1%	1,12 (0,88-1,42)	0,48
	G-A-C	3,8%	3,9%	1,07 (0,69-1,66)	0,82
	G-G-A	1,5%	1,7%	1,13 (0,60-2,14)	0,85
	G-G-C	1,1%	1,1%	1,11 (0,53-2,34)	0,79
rs11623717, rs2071047 e rs2761887	A-G-C	32,8%	34,9%	-	-
	G-A-A	33,4%	30,9%	0,87 (0,74-1,03)	0,13
	A-G-A	21,0%	19,0%	0,85 (0,69-1,04)	0,20
	A-A-A	4,2%	5,5%	1,12 (0,85-1,68)	0,17

rs17563, rs2071047 e rs2761887	G-A-C	3,6%	3,5%	0,91 (0,57-1,43)	0,92
	A-A-C	2,0%	2,0%	0,92 (0,53-1,61)	0,78
	G-G-A	1,6%	2,4%	1,38 (0,80-2,38)	0,16
	G-G-C	1,2%	1,6%	1,09 (0,61-1,97)	0,41
	A-A-A	37,3%	35,3%	-	-
	G-G-C	24,2%	24,9%	1,08 (0,90-1,29)	0,54
	G-G-A	14,4%	13,6%	0,97 (0,77-1,22)	0,52
	A-G-C	9,8%	11,6%	1,20 (0,95-1,53)	0,17
	A-G-A	8,0%	7,9%	1,02 (0,77-1,35)	0,89
A-A-C	5,3%	4,5%	0,88 (0,60-1,30)	0,45	

## c) Quatro SNPs

Haplótipo*	Controle	FL±PNS	OR (95% IC)	Valor de <i>p</i>
G-A-A-A	33,1%	30,6%	-	-
A-G-G-C	23,3%	24,0%	1,10 (0,92-1,33)	0,59
A-G-G-A	13,2%	12,3%	0,98 (0,77-1,25)	0,40
A-A-G-C	9,5%	10,8%	1,21 (0,94-1,55)	0,28
A-A-G-A	7,7%	6,8%	0,95 (0,70-1,28)	0,46
A-A-A-A	4,2%	4,8%	1,25 (0,87-1,79)	0,48
G-A-A-C	3,5%	3,2%	0,95 (0,59-1,53)	0,65
A-A-A-C	1,9%	1,4%	0,82 (0,43-1,56)	0,56
G-G-G-A	1,1%	1,4%	1,22 (0,58-2,55)	0,45

\*Sequência: rs11633717, rs17563, rs2071047 e rs2761887.

Em seguida, nós realizamos a análise pareada da interação SNP-SNP entre os SNPs em *BMP4* com SNPs nos genes *FGFR1*, *GREM1*, *NOG*, *VAX1* e no locus 4p16.2, utilizando dados de trabalhos anteriormente publicados por nosso grupo de pesquisa (do Rego Borges et al., 2015; Aquino et al., 2014; Machado et al., 2016; Machado et al., 2022; Viena et al., 2019; Machado et al., 2022a; Machado et al., 2022b). Estas análises revelaram 13 pares de SNPs em interação de significância com *BMP4* após correção do valor de p por teste de permutação (Tabela 13). Nossos resultados encontraram interações altamente significativas entre 3 polimorfismos de *BMP4* com *VAX1* após correção: rs11623717-rs7078160 ( $p < 0,001$ ), rs2071047-rs7078160 ( $p < 0,001$ ), rs2761887-rs7078160 ( $p < 0,001$ ) (Tabela 13). Além disso, as interações que ocorreram entre os polimorfismos em *VAX1* e em *BMP4* foram as que apresentaram o maior número de genótipos de risco envolvidos (NH<sup>a</sup> variando entre 4 a 5). Também foram vistas interações significantes entre rs11623717 (*BMP4*) e rs227731 (*NOG*) ( $p = 0,006$ ) e entre rs2761887 (*BMP4*) e rs13317 (*FGFR1*) ( $p = 0,004$ ) (Tabela 13) e as interações envolvendo rs11623717 (*BMP4*) e rs7829058 (*FGFR1*) ( $p = 0,033$ ) e rs17563 (*BMP4*) e rs3741442 (12q13.13) ( $p = 0,046$ ) foram detectados com valores de p limítrofes (Tabela 13). As interações que ocorreram entre os polimorfismos rs16969816 (*GREM1*), rs1907989 (4p16.2), rs7829058 (*FGFR1*) e rs11623717 em *BMP4* foram apenas entre genótipos de risco, porém apenas a interação entre rs7829058 (*FGFR1*) e 11623717 (*BMP4*) conseguiu se manter significativa após a correção por permutação.

**Tabela 13.** Interações entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) preditivos de risco para fissura labial com ou sem fissura palatina não sindrômica (FL±PNS), com base no modelo de redução da dimensionalidade multifatorial.

SNP1	SNP2	NH <sup>a</sup>	betaH <sup>b</sup>	NL <sup>c</sup>	betaL <sup>d</sup>	Valor de P <sup>e</sup>	Valor de P Permutado <sup>f</sup>
rs11623717 ( <i>BMP4</i> )	rs7078160 ( <i>VAX1</i> )	4	1.0379	3	-1.0703	5,78e-12	<b>&lt; 0.001</b>
rs17563 ( <i>BMP4</i> )	rs7078160 ( <i>VAX1</i> )	4	1.1734	2	-0.8632	3,51e-11	<b>&lt; 0.001</b>
rs2071047 ( <i>BMP4</i> )	rs7078160 ( <i>VAX1</i> )	5	1.0380	2	-0.9120	8,29e-11	<b>&lt; 0.001</b>
rs2761887 ( <i>BMP4</i> )	rs7078160 ( <i>VAX1</i> )	4	1.0078	2	-0.8797	2,99e-10	<b>&lt; 0.001</b>
rs11623717 ( <i>BMP4</i> )	rs227731 ( <i>NOG</i> )	2	0.5105	2	-0.8003	3,19e-04	<b>0.006</b>
rs2761887 ( <i>BMP4</i> )	rs13317 ( <i>FGFR1</i> )	2	0.3653	2	-0.4633	4,13e-04	<b>0.004</b>
rs2071047 ( <i>BMP4</i> )	rs16969862 ( <i>GREM1</i> )	2	0.3579	2	-0.2251	5,78e-04	<b>0.011</b>
rs2071047 ( <i>BMP4</i> )	rs227731 ( <i>NOG</i> )	2	0.5350	2	-0.7447	6,17e-04	<b>0.014</b>
rs2071047 ( <i>BMP4</i> )	rs1907989 (4p16.2)	2	0.5713	1	-0.2096	1,42e-03	<b>0.028</b>
rs17563 ( <i>BMP4</i> )	rs227731 1( <i>NOG</i> )	1	0.7464	1	-0.8022	1,69e-03	<b>0.037</b>
rs2761887 ( <i>BMP4</i> )	rs34246903 (4p16.2)	1	0.3664	2	-0.3929	1,94e-03	<b>0.029</b>
rs2071047 ( <i>BMP4</i> )	rs13317 ( <i>FGFR1</i> )	2	0.3118	2	-0.4146	2,04e-03	<b>0.038</b>
rs11623717 ( <i>BMP4</i> )	rs16969816 ( <i>GREM1</i> )	1	0.3695	0	NA	2,62e-03	> 0.05
rs11623717 ( <i>BMP4</i> )	rs1907989 (4p16.2)	2	0.5451	0	NA	2,75e-03	> 0.05
rs11623717 ( <i>BMP4</i> )	rs7829058 ( <i>FGFR1</i> )	1	0.4396	0	NA	> 0.05	<b>0.033</b>

<sup>a</sup>Número de genótipos significativos de alto risco na interação, <sup>b</sup>Coeficiente de regressão em duas etapas para exposição de alto risco, <sup>c</sup>Número de genótipos significativos de baixo risco na interação, <sup>d</sup>Coeficiente de regressão em duas etapas para exposição de baixo risco, <sup>e</sup>Valor de P para o modelo de interação ajustado para covariáveis, <sup>f</sup>Valor de P permutado para o modelo de interação. Em negrito valores de p significantes após teste de 1000 permutações (p≤0,05).

## 6 DISCUSSÃO

A miscigenação de uma população pode gerar influência sobre os diferentes aspectos que envolvem o estudo das FONS, sendo de extrema importância considerar dados de miscigenação no delineamento dos estudos. Dentre esses aspectos está a variação da taxa de prevalência dos diferentes fenótipos de fissuras que pode variar na população ao comparar um grupo imigrante versus a etnia local do país, pois o grupo imigrante apresenta taxas de FONS semelhantes às de etnias de seus países de origem (Mossey et al., 2009). Outra influência guiada pela miscigenação está na associação de risco no desenvolvimento de FONS, pois diferentes genes podem apresentar alelos com associação protetiva ou de risco de acordo com a ascendência étnica da população avaliada (Viena et al., 2018). Essa variabilidade de associação genética de risco de acordo com ascendência étnica também ocorre no gene *BMP4*, pois ao considerar o OR na população geral para o SNP rs17563 não se obtém associação significativa de risco no desenvolvimento de FLPNS, porém quando a análise é estratificada por etnia, evidencia-se que rs17563 apresenta associação de risco aumentado para FLPNS em população chinesa e brasileira (Bahrami et al., 2020). Porém vale ressaltar que a população brasileira avaliada não teve sua miscigenação considerada. Diferentes resultados após estratificação de populações por etnia já ocorreram em outros genes, como no polimorfismo rs12532 em *MSX1*, que em análise geral de populações de diferentes etnias apresenta associação a FPNS, porém em análise estratificada de acordo com a etnia da população avaliada o mesmo SNP é fator de proteção para FPNS em populações com ascendência asiática e caucasiana, e não houve associação com formação de FONS em população miscigenada da América Latina (Gu et al., 2018). No presente estudo, os polimorfismos rs11623717, rs17563, rs2071047 e rs2761887 não apresentaram associações relevantes com grupos FL±PNS, FLNS e FLPNS em análise sem divisão por ascendência étnica, mas levando-se em conta como fator de confusão dados de miscigenação do grupo. Porém, após divisão por ascendência, o grupo com maior ancestralidade africana revelou relação de risco de rs2761887 para o desenvolvimento de FL±PNS, com poder estatístico de 99,4%.

Como exposto, a múltipla etnia de uma população exerce influência direta na associação de risco de um gene candidato à ocorrência de FONS em uma população,

esta relação também pode ser vista na divergência na frequência alélica entre as populações mundiais estudadas (Machado et al., 2019). Entretanto, apesar do polimorfismo rs2761887 em *BMP4* apresentar associação de risco para o desenvolvimento de FONS em população brasileira com maior ancestralidade africana, a frequência alélica de acordo com a etnia para este SNP é de 0,54 e de 0,56 para populações africanas e europeias, respectivamente, segundo dados do projeto 1000 genomes (<https://www.genome.gov/27528684/1000-genomes-project>), não apresentando grande divergência entre estas etnias. E em nosso estudo a frequência alélica encontrada foi de 0,39 para o alelo A do polimorfismo rs2761887 em *BMP4*. A variação da frequência alélica entre populações é visualizada no SNP rs17563, um dos mais estudados no gene, e também o que mais apresenta heterogeneidade nas frequências alélicas (Machado et al., 2018). A frequência global média do alelo G do polimorfismo rs17563 em *BMP4* é 0,39 (Hu et al., 2015), para etnia africana a frequência alélica é 0,18 e para etnia europeia é 0,45 (1000 Genomes Project). No presente estudo, a frequência alélica encontrada para este polimorfismo foi 0,39, estando próxima da frequência de 0,38 encontrada por Araújo et al. (2012) também na população brasileira para o polimorfismo rs17563 em *BMP4*.

Apesar de as análises de polimorfismos de modo individual resultarem em descobertas significativas, a análise de haplótipos torna-se uma alternativa adicional interessante e poderosa para o mapeamento de genes de susceptibilidade ao desencadeamento de desordens, por proporcionar dados sobre desequilíbrio de ligação dos SNPs alvos e fornecer um painel mais próximo da realidade sobre o padrão de herança do respectivo gene (Liu et al., 2008). No estudo realizado por Ren et al. (2011) houve associação de haplótipos no gene *BMP4* com o risco de desenvolvimento e aumento da gravidade da ossificação do ligamento longitudinal posterior (OPLL) em população chinesa, e os autores consideram que o haplótipo TGGGCTT formado pelos SNPs em *BMP4* está associado a superexpressão do mRNA de *BMP4* ou da proteína BMP4 na matriz extracelular das células do ligamento longitudinal posterior em pacientes com OPLL. A análise de haplótipos do presente estudo não obteve associação de significância entre haplótipos de *BMP4* e a ocorrência de FL±PNS.

A análise da interação gene-gene pode trazer informações preditivas importantes sobre a formação de doenças multifatoriais altamente complexas como

as FONS (Wang et al, 2020), pois o efeito produzido por SNPs de maneira isolada nos fenótipos de doenças complexas pode ser mascarado por resultados de alterações epigenéticas resultantes da dinâmica das interações entre genes, somada a influência de fatores de confusão não genéticos, como os fatores ambientais (Liu, et al. 2016). Nossos resultados apontam fortes interações entre os SNPs rs11623713, rs2071047 e rs2761887 em *BMP4* e o rs7078160 localizado no gene *VAX1*. O gene *VAX1* codifica um regulador transcricional, que exerce funções essenciais para o desenvolvimento craniofacial humano, tendo já sido associado ao desenvolvimento das FL±PNS (Chai et al., 2021). Em células cultivadas derivadas da vesícula óptica de camundongos silenciados para o gene *Shh*, observou-se uma regulação negativa de *BMP4* sobre *VAX1*. *SHH* é um gene que atua de forma antagônica a *BMP4* durante o desenvolvimento (Zhao et al., 2010). Assim como rs2761887 em *BMP4*, o polimorfismo rs7078160 de *VAX1* também foi associado a formação de FL±PNS em população brasileira com enriquecimento da ancestralidade africana (do Rego Borges et al., 2015).

Outra interação SNP-SNP positiva foi com rs227731 em *NOG*. O gene *NOG* é conhecido como antagonista específico da via de *BMP4*, por sintetizar a proteína Noggin que se liga ao receptor celular das BMPs, impedindo a ligação de *BMP4* (Krause et al., 2011). He et al. (2010) investigaram o papel da sinalização de Noggin e BMP na palatogênese em camundongos com silenciamento para *NOG*, seus resultados demonstraram que a inativação de Noggin leva a formação de FP, pois a inibição da via das BMPs realizada por Noggin é indispensável para manutenção da integridade do epitélio palatino durante o desenvolvimento normal do palato. Olivares-Navarrete et al. (2014), ao avaliar o silenciamento de *NOG* em cultura de células MG63 semelhantes a osteoblastos humanos, relataram o forte aumento dos níveis de *BMP2* e *BMP4* e assim, maior diferenciação de osteoblastos e maior gênese de osteoclastos. O SNP rs227731 está localizado em região intergênica do cromossomo 17q22, podendo estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos ou ter efeitos regulatórios em genes adjacentes (Aquino et al., 2014). Em estudo anterior, esse mesmo polimorfismo foi relatado como fator de risco para FLPNS em uma população brasileira com enriquecimento da ancestralidade europeia (Aquino et al., 2014).

Os polimorfismos rs2761887 e rs2071047 em *BMP4* apresentaram interações significativas com rs13317 e rs7829058 do gene *FGFR1*. A via de sinalização de FGFs faz parte das múltiplas vias sinalizadoras na palatogênese e uma sinalização inadequada nessa via pode contribuir com até 5% dos casos de FONS (Riley et al., 2007). Durante a diferenciação osteogênica, as expressões de FGF1 e 2 reduzem acentuadamente os genes marcadores precoces de comprometimento osteogênico, como *BMP4*, agindo de formas antagônicas *BMP4* (Simann et al., 2017). Durante a palatogênese de camundongos com deleção de *Fgfr1* em células da crista neural, observou-se o retardo da proliferação celular do mesênquima e epitélio, impedindo o desenvolvimento dos processos nasais e mediais e a elevação das cristas palatinas de forma a não completar a fusão do palato (Wang et al. 2013). O SNP rs13317 de *FGFR1* foi associado à proteção em reparo ósseo sem intercorrências em população brasileira, enquanto que haplótipos contendo rs17563 estão ligados a falhas de reparação óssea adequada por interferir na homeostase óssea (Guimarães et al., 2013). Além disso, a interação gene-gene entre haplótipos de rs2761884 em *BMP4* e rs4631909 em *FGF3* foi associada a proteção de ocorrência de peri-implantite em população brasileira (Coelho et al., 2016). Resultados prévios revelaram que rs13317 em *FGFR1* reduz o risco de FL±PNS na população brasileira (Machado et al., 2022), porém nenhuma associação foi encontrada para rs7829058 na mesma população (Machado et al., 2016).

O SNP rs16969862 em *GREM1* interagiu significativamente com rs2071047 em *BMP4*. Apesar de *GREM1* não demonstrar efeitos craniofaciais durante a embriogênese em estudos funcionais com camundongos deficientes para *Grem1*, este gene é relatado como antagonista clássico de BMPs (Ludwig et al., 2016). *GREM1* pode apresentar diferentes níveis de afinidade de ligação com BMPs em células do epitélio renal, por exemplo, havendo uma preferência de *GREM1* por BMP2 e BMP4 sobre as outras BMPs. Porém, vale ressaltar que esse efeito foi visualizado apenas in vitro (Church et al., 2015). Em estudo anterior na população brasileira, o SNP rs16969862 em *GREM1* foi associado com um risco reduzido para o desenvolvimento de FL±PNS (Viana et al., 2018).

Os SNPs rs1907989 e rs34246903 na região cromossômica 4p16.2 demonstraram associações significativas com rs2071047 e rs1761887 em *BMP4*, respectivamente. O locus 4p16.2 é uma região intergênica, contendo os genes *EVC* e

EVC2, que já foram associados a síndromes que atingem o complexo craniofacial em humanos (Qian et al., 2022), e a variante rs34246903 de 4p16.2 já foi associada a um menor risco de desenvolvimento de FLNS na população brasileira (Machado et al., 2022). Interações funcionais entre EVC e EVC2 com BMP4 ainda não foram descritas na literatura, entretanto, 4p16.2 está localizado próximo ao gene *MSX1* (Msh Homeobox1), e já foi relatado que deleções de até 12 kb sobrepueram o gene *MSX1* em humanos (Silva et al., 2018). *MSX1* é um gene frequentemente estudado por sua importância no desenvolvimento de fissuras orofaciais, e já foi demonstrado que *MSX1* ativa a expressão de BMP4 no mesênquima durante a morfogênese dental em camundongos (Jia et al., 2013). Mutações de perda de função em *MSX1* em humanos levam a agenesia dentária de molares e segundos pré-molares (Vastardis et al., 1996). Curiosamente, nosso estudo encontrou interação significativa entre 4p16.2 e BMP4, mas o mesmo não foi válido para a interação entre rs62636562 em *MSX1* e BMP4 (dado não mostrado). Machado et al (2022) não descartam a possibilidade do polimorfismo rs34246903 de 4p16.2 estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos, segregando conjuntamente com uma variante causal ainda desconhecida para fissuras orofaciais ou apresentar efeitos regulatórios em genes próximos, como *MSX1*. São necessários mais esforços para investigar esta interação entre os SNPs nos loci 4p16.2 com os tag-SNPs em *BMP4* para esclarecer os mecanismos pelos quais ela está relacionada com o desenvolvimento de FONS.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo apontam para um risco aumentado de FL±PNS em indivíduos brasileiros com ancestralidade africana na presença do polimorfismo rs2761887 em *BMP4*. Além disso, as análises de interações revelaram vários resultados significativos, sugerindo que *BMP4* pode, individualmente ou interagindo com *FGFR1*, *GREM1*, *NOG*, *VAX1* e o locus 4p16.2 contribuir para o risco das FL±PNS na população brasileira.

## REFERÊNCIAS

- Abdo R, Machado M. *Odontopediatria nas fissuras labiopalatais*. São Paulo: Santos; 2005.
- Allori AC, Cragan JD, Cassell CH, Marcus JR. ICD-10-based expanded code set for use in cleft lip/palate research and surveillance. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2016 Nov;106(11):905-914. doi: 10.1002/bdra.23544. PMID: 27891780.
- Antunes, Leonardo Santos, Erika Calvano KÜchler, Patricia Nivoloni Tannure, Marcelo Castro Costa, Cresus Vinicius Depes Gouvêa, Beni Olej, and Jose Mauro Granjeiro. 2013. "BMP4 Polymorphism Is Associated with Nonsyndromic Oral Cleft in a Brazilian Population." *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 50 (6): 633–38. <https://doi.org/10.1597/12-048>.
- Aquino, Sibeles Nascimento de, Ana Camila Messetti, Ryuchi Hoshi, Andréa Borges, Camila Sane Viena, Sílvia R.A. Reis, Mário Sérgio Oliveira Swerts, Edgard Graner, Hercílio Martelli-Júnior, and Ricardo D. Coletta. 2014. "Analysis of Susceptibility Polymorphisms for Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in the Brazilian Population." *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology* 100 (1): 36–42. <https://doi.org/10.1002/bdra.23204>.
- Araujo, Tânia Kawasaki De, Rodrigo Secolin, Têmis Maria Félix, Liliâne Todeschini De Souza, Marshall Ítalo Barros Fontes, Isabella Lopes Monlleó, Josiane De Souza, et al. 2016. "A Multicentric Association Study between 39 Genes and Nonsyndromic Cleft Lip and Palate in a Brazilian Population." *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 44 (1): 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2015.07.026>.
- Araújo, Tânia Kawasaki, Milena Simioni, Têmis Maria Félix, Liliâne Todeschini de Souza, Marshall Ítalo Barros Fontes, Isabella Lopes Monlleó, Josiane Souza, et al. 2012. "Preliminary Analysis of the Nonsynonymous Polymorphism Rs17563 in BMP4 Gene in Brazilian Population Suggests Protection for Nonsyndromic Cleft Lip and Palate ." *Plastic Surgery International* 2012: 1–5. <https://doi.org/10.1155/2012/247104>.
- Aylsworth AS, Allori AC, Pimenta LA, Marcus JR, Harmsen KG, Watkins SE, Ramsey BL, Strauss RP, Meyer RE. Issues involved in the phenotypic classification of orofacial clefts ascertained through a state birth defects registry for the North Carolina Cleft Outcomes Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2015 Nov;103(11):899-903. doi: 10.1002/bdra.23415. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26251069.
- Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet*. 2006; 70(5): 658-65.
- Beaty, Terri H, Jeffrey C Murray, Mary L Marazita, Ronald G Munger, Ingo Ruczinski, Jacqueline B Hetmanski, Kung Yee Liang, et al. 2010. "NIH Public Access" 42 (6): 525–29. <https://doi.org/10.1038/ng.580.A>.
- Bell JC, Raynes-Greenow C, Turner RM, Bower C, Nassar N, O'Leary CM. Maternal alcohol consumption during pregnancy and the risk of orofacial clefts in infants: a

systematic review and meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2014 Jul;28(4):322-32. doi: 10.1111/ppe.12131. Epub 2014 May 6. PMID: 24800624.

Beynum, Ingrid M. Van, Livia Kapusta, Marian K. Bakker, Martin Den Heijer, Henk J. Blom, and Hermien E.K. De Walle. 2010. "Protective Effect of Periconceptional Folic Acid Supplements on the Risk of Congenital Heart Defects: A Registry-Based Case-Control Study in the Northern Netherlands." *European Heart Journal* 31 (4): 464–71. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp479>.

Bezerra J, Oliveira G, Soares C, Cardoso M, Ururahy M, Neto F, et al. Genetic and non-genetic factors that increase the risk of non-syndromic cleft lip and/or palate development. *Oral Dis.* 2014; 1-7.

Bezerra JF, Silva HPVD, Bortolin RH, Luchessi AD, Ururahy MAG, Loureiro MB, Gil-da-Silva-Lopes VL, Almeida MDG, Amaral VSD, Rezende AA. IRF6 polymorphisms in Brazilian patients with non-syndromic cleft lip with or without palate. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2020 Nov-Dec;86(6):696-702. doi: 10.1016/j.bjorl.2019.04.011. Epub 2019 Jun 8. PMID: 31495697.

Bjørn AM, Ehrenstein V, Nohr EA, Nørgaard M. Use of inhaled and oral corticosteroids in pregnancy and the risk of malformations or miscarriage. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015 Apr;116(4):308-14. doi: 10.1111/bcpt.12367. Epub 2015 Jan 22. PMID: 25515299.

Bjørn AM, Ehrenstein V, Nohr EA, Nørgaard M. Use of inhaled and oral corticosteroids in pregnancy and the risk of malformations or miscarriage. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015 Apr;116(4):308-14. doi: 10.1111/bcpt.12367. Epub 2015 Jan 22. PMID: 25515299.

Blanco, Rafael, Alicia Colombo, Rosa Pardo, and José Suazo. 2017. "Haplotype-Based Gene–Gene Interaction of Bone Morphogenetic Protein 4 and Interferon Regulatory Factor 6 in the Etiology of Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in a Chilean Population." *European Journal of Oral Sciences* 125 (2): 102–9. <https://doi.org/10.1111/eos.12332>.

Brito LA, Bassi CF, Masotti C, Malcher C, Rocha KM, Schlesinger D, Bueno DF, Cruz LA, Barbara LK, Bertola DR, Meyer D, Franco D, Alonso N, Passos-Bueno MR. IRF6 is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population. *Am J Med Genet A.* 2012 Sep;158A(9):2170-5. doi: 10.1002/ajmg.a.35526. Epub 2012 Aug 6. PMID: 22887868.

Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science.* 1998 May 29;280(5368):1455-7. doi: 10.1126/science.280.5368.1455. PMID: 9603738.

Candotto V, Oberti L, Gabrione F, Greco G, Rossi D, Romano M, Mummolo S. Current concepts on cleft lip and palate etiology. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2019 May-Jun;33(3 Suppl. 1):145-151. DENTAL SUPPLEMENT. PMID: 31538461.

Chattopadhyay, Amrita, and Tzu-pin Lu. 2019. "Gene-Gene Interaction : The Curse of Dimensionality" 7 (5): 1–5. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.12.87>.

Chen, D I, Ming Zhao, and Gregory R Mundy. 2004. "Bone Morphogenetic Proteins" 22 (December): 233–41. <https://doi.org/10.1080/08977190412331279890>.

Chicco D, Faultless T. Brief Survey on Machine Learning in Epistasis. *Methods Mol Biol.* 2021;2212:169-179. doi: 10.1007/978-1-0716-0947-7\_11. PMID: 33733356.

Coelho RB, Gonçalves R Junior, Villas-Boas Rde M, Bonato LL, Quinelato V, Pinheiro Ada R, Machado A, Nunes CH, Gonçalves R, Vieira AR, Granjeiro JM, Casado PL. Haplotypes in BMP4 and FGF Genes Increase the Risk of Peri-Implantitis. *Braz Dent J.* 2016 Jul-Aug;27(4):367-74. doi: 10.1590/0103-6440201600899. PMID: 27652695.

Compagnucci C, Martinus K, Griffin J, Depew MJ. Programmed Cell Death Not as Sledgehammer but as Chisel: Apoptosis in Normal and Abnormal Craniofacial Patterning and Development. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Oct 8;9:717404. doi: 10.3389/fcell.2021.717404. PMID: 34692678; PMCID: PMC8531503.

Dinis-Oliveira RJ. Usos Lícito e Ilícito dos Fármacos [Licit and illicit uses of medicines]. *Acta Med Port.* 2014 Nov-Dec;27(6):755-66. Portuguese. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25641292.

Dixon, Michael J., Mary L. Marazita, Terri H. Beaty, and Jeffrey C. Murray. 2011. "Cleft Lip and Palate: Understanding Genetic and Environmental Influences." *Nature Reviews Genetics* 12 (3): 167–78. <https://doi.org/10.1038/nrg2933>.

do Nascimento RL, Castilla EE, Dutra MDG, Orioli IM. ICD-10 impact on ascertainment and accuracy of oral cleft cases as recorded by the Brazilian national live birth information system. *Am J Med Genet A.* 2018 Apr;176(4):907-914. doi: 10.1002/ajmg.a.38634. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29424949.

Dupépe, Esther B MD, MSPH; Kicielinski, Kimberly P MD, MSPH; Gordon, Amber S MD; Walters, Beverly C MD, MSc, FRCSC , O que é um estudo de caso-controle?, *Neurocirurgia*: abril de 2019 - Volume 84 - Edição 4 - p 819-826 doi: 10.1093/neuros/nyy590.

Erdogan F, Ullmann R, Chen W, Schubert M, Adolph S, Hultschig C, Kalscheuer V, Ropers HH, Spaich C, Tzschach A. Characterization of a 5.3 Mb deletion in 15q14 by comparative genomic hybridization using a whole genome "tiling path" BAC array in a girl with heart defect, cleft palate, and developmental delay. *Am J Med Genet A.* 2007 Jan 15;143A(2):172-8. doi: 10.1002/ajmg.a.31541. PMID: 17163532.

Everson JL, Fink DM, Yoon JW, Leslie EJ, Kietzman HW, Ansen-Wilson LJ, Chung HM, Walterhouse DO, Marazita ML, Lipinski RJ. Sonic hedgehog regulation of Foxf2 promotes cranial neural crest mesenchyme proliferation and is disrupted in cleft lip morphogenesis. *Development.* 2017 Jun 1;144(11):2082-2091. doi: 10.1242/dev.149930. Epub 2017 May 15. PMID: 28506991; PMCID: PMC5482988.

Feitosa, Mary F. n.d. "O Futuro Da Epidemiologia Genética de Características Complexas Future of Genetic Epidemiology in Complex Traits," 73–84.

Firmino, Giselle, and Torres De Sousa. 2017. "Orofacial Clefts in Brazil and Surgical Rehabilitation under the Brazilian National Health System" 31: 1–10.

Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*. 2011 Nov 11;147(4):742-58. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.033. Erratum in: *Cell*. 2011 Dec 23;147(7):1640. PMID: 22078876; PMCID: PMC4511103.

Goncalves Leite, Isabel Cristina, and Sergio Koifman. 2009. "Oral Clefts, Consanguinity, Parental Tobacco and Alcohol Use: A Case-Control Study in Rio de Janeiro, Brazil." *Brazilian Oral Research* 23 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1590/s1806-83242009000100006>.

Gong, Siew Ging, and Chiao Guo. 2003. "Bmp4 Gene Is Expressed at the Putative Site of Fusion in the Midfacial Region." *Differentiation* 71 (3): 228–36. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2003.710304.x>.

Gooding S, Leedham SJ. Gremlin 1 - small protein, big impact: the multiorgan consequences of disrupted BMP antagonism†. *J Pathol*. 2020 Aug;251(4):349-352. doi: 10.1002/path.5479. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32472605; PMCID: PMC8576570.

Grosen, D, Chevrier, C, Skytthe, A, Bille, C, Mølsted, K, Sivertsen, A, Murray, JC, Christensen, K. A cohort study of recurrence patterns among more than 54,000 relatives of oral cleft cases in Denmark: support for the multifactorial threshold model of inheritance. *J Med Genet*. 2010;47(3):162-168

Gu M, Zhang Y, Liu H, Liu J, Zhu D, Yang X. MSH homeobox 1 polymorphisms and the risk of non-syndromic orofacial clefts: a meta-analysis. *Eur J Oral Sci*. 2018 Jun;126(3):180-185. doi: 10.1111/eos.12414. Epub 2018 Apr 17. PMID: 29664137.

Guimarães, João Matheus, Isabel Cristina Do Val Guimarães, Maria Eugenia Leite Duarte, Thays Vieira, Verônica Fernandes Vianna, Marco Bernardo Cury Fernandes, Alexandre Rezende Vieira, e Priscila Ladeira Casado. 2013. "Polymorphisms in BMP4 and FGFR1 Genes Are Associated with Fracture Non-Union." *Journal of Orthopaedic Research* 31 (12): 1971–79. <https://doi.org/10.1002/jor.22455>.

Hammond, Nigel L., and Michael J. Dixon. 2022. "Revisiting the Embryogenesis of Lip and Palate Development." *Oral Diseases*, no. February: 1306–26. <https://doi.org/10.1111/odi.14174>.

Hao, Jiansuo, Ruirui Gao, Wenli Wu, Liang Hua, Yiyang Chen, Fan Li, Jiayu Liu, Dongyuan Luo, Jin Han, and Hongtao Wang. 2018. "Association between BMP4 Gene Polymorphisms and Cleft Lip with or without Cleft Palate in a Population from South China." *Archives of Oral Biology* 93 (April): 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.05.015>.

Harville, Emily W., Allen J. Wilcox, Rolv Terje Lie, Hallvard Vindenes, e Frank Åbyholm. 2005. "Cleft Lip and Palate versus Cleft Lip Only: Are They Distinct Defects?" *American Journal of Epidemiology* 162 (5): 448–53. <https://doi.org/10.1093/aje/kwi214>.

He F, Xiong W, Wang Y, Matsui M, Yu X, Chai Y, Klingensmith J, Chen Y. Modulation of BMP signaling by Noggin is required for the maintenance of palatal epithelial integrity during palatogenesis. *Dev Biol*. 2010 Nov 1;347(1):109-21. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.08.014. Epub 2010 Aug 19. PMID: 20727875; PMCID: PMC3010875.

Honein, Margaret A., Sonja A. Rasmussen, Jennita Reefhuis, Paul A. Romitti, Edward J. Lammer, Lixian Sun, and Adolfo Correa. 2007. "Maternal Smoking and Environmental Tobacco Smoke Exposure and the Risk of Orofacial Clefts." *Epidemiology* 18 (2): 226–33. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000254430.61294.c0>.

Houkes, Ruben, Johannes Smit, Peter Mossey, Peter Don Griot, Martin Persson, Amanda Neville, Edwin Ongkosuwito, Tom Sitzman, and Corstiaan Breugem. 2021. "Classification Systems of Cleft Lip, Alveolus and Palate: Results of an International Survey." *Cleft Palate-Craniofacial Journal*. <https://doi.org/10.1177/10556656211057368>.

Hu, Jie, Zhishuo Ou, Elena Infante, Sally J. Kochmar, Suneeta Madan-Khetarpal, Lori Hoffner, Shafagh Parsazad, e Urvashi Surti. 2017. "Chromosome 12q13.13q13.13 Microduplication and Microdeletion: A Case Report and Literature Review." *Molecular Cytogenetics* 10 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13039-017-0326-4>.

Hu, Yuan Yuan, Chuan Qi Qin, Mo Hong Deng, Yu Ming Niu, and Xing Long. 2015. "Association between BMP4 Rs17563 Polymorphism and NSCL/P Risk: A Meta-Analysis." *Disease Markers* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/763090>.

I.A. Van Rooij, M.J. Wegerif, H.M. Roelofs, W.H. Peters, A.M. Kuijpers-Jagtman, G.A. Zielluis, et al. Smoking, genetics polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environment interaction. *Epidemiology*, 12 (2001), pp. 502-507

Jia, Shihai, Jing Zhou, Yang Gao, Jin A. Baek, James F. Martin, Yu Lan, e Rulang Jiang. 2013. "Roles of Bmp4 during Tooth Morphogenesis and Sequential Tooth Formation." *Development (Cambridge)* 140 (2): 423–32. <https://doi.org/10.1242/dev.081927>.

Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn*. 2006 May;235(5):1152-66. doi: 10.1002/dvdy.20646. PMID: 16292776; PMCID: PMC2562450.

Jiayan 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*. 2010 Jan;39(1):50-6. doi: 10.1016/j.ijom.2009.10.010. Epub 2009 Nov 14. PMID: 19914800.

Källén B. Maternal drug use and infant cleft lip/palate with special reference to corticoids. *Cleft Palate Craniofac J*. 2003 Nov;40(6):624-8. doi: 10.1597/02-077. PMID: 14577813.

Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M, John N, Sommer L, Graf D, et al. The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2011; 121(7-8): 636-46.

"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."

Krause, Carola, Asja Guzman, e Petra Knaus. 2011. "Noggin." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 43 (4): 478–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.01.007>.

Kriens, O. What Is a Cleft Lip and Palate? A Multidisciplinary Update: Proceedings of an Advanced Workshop, Bremen 1987. Stuttgart, Germany: Thieme; 1989.

Leite IC, Paumgarten FJ, Koifman S. Chemical exposure during pregnancy and oral clefts in newborns. *Cad Saude Publica*. 2002; 18(1): 17-31.

Leong, L I Ming, and Paul M Brickell. 1996. "Bone Morphogenetic Protein-4" 28 (12): 1293–96.

Leslie EJ. Genetic models and approaches to study orofacial clefts. *Oral Dis*. 2022 Jul;28(5):1327-1338. doi: 10.1111/odi.14109. Epub 2022 Jan 6. PMID: 34923716.

Leslie, Ej, and Jc Murray. 2013. "Evaluating Rare Coding Variants as Contributing Causes to Non-Syndromic Cleft Lip and Palate." *Clinical Genetics* 84 (5): 496–500. <https://doi.org/10.1111/cge.12018>.

Letra A, Silva RA, Menezes R, Astolfi CM, Shinohara A, de Souza AP, et al. MMP gene polymorphisms as contributors for cleft lip/palate: association with MMP3 but not MMP1. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(10): 954-60.

Li, Yue Hua, Jiaomei Yang, Ju Lei Zhang, Jia Qi Liu, Zhao Zheng, and Da Hai Hu. 2017. "BMP4 Rs17563 Polymorphism and Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate." *Medicine (United States)* 96 (31). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007676>.

Lin, Jian Yan, Yong Juan Chen, Yuan Lu Huang, Guang Peng Tang, Li Zhang, Bing Deng, Ming Li, Hong Ma, and Rong Sheng Luan. 2008. "Association of Bone Morphogenetic Protein 4 Gene Polymorphisms with Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in Chinese Children." *DNA and Cell Biology* 27 (11): 601–5. <https://doi.org/10.1089/dna.2008.0777>.

Line, Sergio Roberto Peres, Aidar, Marisi. 2007. "A Simple and Cost-Effective Protocol for DNA Isolation from Buccal Epithelial Cells" 18: 148–52.

Liu D, Schwender H, Wang M, Wang H, Wang P, Zhu H, Zhou Z, Li J, Wu T, Beaty TH. Gene-gene interaction between MSX1 and TP63 in Asian case-parent trios with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res*. 2018 Mar 1;110(4):317-324. doi: 10.1002/bdr2.1139. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29341488.

Liu D, Schwender H, Wang M, Wang H, Wang P, Zhu H, Zhou Z, Li J, Wu T, Beaty TH. Gene-gene interaction between MSX1 and TP63 in Asian case-parent trios with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res*. 2018 Mar 1;110(4):317-324. doi: 10.1002/bdr2.1139. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29341488.

Liu D, Wang M, Yuan Y, Schwender H, Wang H, Wang P, Zhou Z, Li J, Wu T, Zhu H, Beaty TH. Gene-gene interaction among cell adhesion genes and risk of nonsyndromic

cleft lip with or without cleft palate in Chinese case-parent trios. *Mol Genet Genomic Med*. 2019 Oct;7(10):e00872. doi: 10.1002/mgg3.872. Epub 2019 Aug 16. PMID: 31419083; PMCID: PMC6785639.

Liu N, Zhang K, Zhao H. Haplotype-association analysis. *Adv Genet*. 2008;60:335-405. doi: 10.1016/S0065-2660(07)00414-2. PMID: 18358327.

Liu, Wei, Xiaoxia Sun, Alen Braut, Yuji Mishina, Richard R. Behringer, Mina Mina, and James F. Martin. 2005. "Distinct Functions for Bmp Signaling in Lip and Palate Fusion in Mice." *Development* 132 (6): 1453–61. <https://doi.org/10.1242/dev.01676>.

Lo HF, Hong M, Krauss RS. Concepts in Multifactorial Etiology of Developmental Disorders: Gene-Gene and Gene-Environment Interactions in Holoprosencephaly. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Dec 22;9:795194. doi: 10.3389/fcell.2021.795194. PMID: 35004690; PMCID: PMC8727999.

Lorente C, Cordier S, Goujard J, Ayme S, Bianchi F, Calzolari E, et al. Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Am J Public Health*. 2000; 90(3): 415-9

Lu, Hongbing, Yan Jin, and George L. Tipoe. 2000. "Alteration in the Expression of Bone Morphogenetic Protein-2,3,4,5 mRNA during Pathogenesis of Cleft Palate in BALB/c Mice." *Archives of Oral Biology* 45 (2): 133–40. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(99\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(99)00118-1).

Luan YZ, Zuo XY, Liu K, Li G, Rao SQ. Advances in development of gene-gene interaction analysis methods based on SNP data: a review. *Yi Chuan*. 2013 Dec;35(12):1331-9. Chinese. doi: 10.3724/sp.j.1005.2013.01331. PMID: 24645342.

Machado RA, Messetti AC, de Aquino SN, Martelli-Júnior H, Swerts MS, de Almeida Reis SR, Moreira HS, Persuhn DC, Coletta RD. Association Between Genes Involved in Craniofacial Development and Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate in the Brazilian Population. *Cleft Palate Craniofac J*. 2016b Sep;53(5):550-6. doi: 10.1597/15-107. Epub 2015 Sep 24. PMID: 26402724.

Machado RA, Messetti AC, de Aquino SN, Martelli-Júnior H, Swerts MS, de Almeida Reis SR, Moreira HS, Persuhn DC, Coletta RD. Association Between Genes Involved in Craniofacial Development and Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate in the Brazilian Population. *Cleft Palate Craniofac J*. 2016c Sep;53(5):550-6. doi: 10.1597/15-107. Epub 2015 Sep 24. PMID: 26402724.

Machado RA, Moreira HSB, de Aquino SN, Martelli-Junior H, de Almeida Reis SR, Persuhn DC, Wu T, Yuan Y, Coletta RD. Interactions between RAD51 rs1801321 and maternal cigarette smoking as risk factor for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Am J Med Genet A*. 2016 Feb;170A(2):536-539. doi: 10.1002/ajmg.a.37281. Epub 2015 Oct 27. PMID: 26507587.

Machado, Renato Assis, Ana Camila Messetti, Sibeles Nascimento De Aquino, Hercílio Martelli-Júnior, Mário Sérgio Oliveira Swerts, Silvia Regina De Almeida Reis, Helenara Salvati Bertolossi Moreira, Darlene Camati Persuhn, and Ricardo D. Coletta. 2016a. "Association between Genes Involved in Craniofacial Development and Nonsyndromic

Cleft Lip and/or Palate in the Brazilian Population.” *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 53 (5): 550–56. <https://doi.org/10.1597/15-107>.

Machado, Renato Assis, Ana Lúcia Carrinho Ayroza Rangel, Silvia Regina de Almeida Reis, Rafaela Scariot, Ricardo D. Coletta, and Hercílio Martelli-Júnior. 2022. “Evaluation of Genome-Wide Association Signals for Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in a Multiethnic Brazilian Population.” *Archives of Oral Biology* 135 (December 2021): 105372. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105372>.

Machado, Renato Assis, Silvia Regina, Reis Eliete, Neves Silva, and Guerra Ricardo. 2018. “Potential Genetic Markers for Nonsyndromic Oral Clefts in the Brazilian Population: A Systematic Review and Meta-Analysis” 1: 1–13. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1208>.

Maili L, Letra A, Silva R, Buchanan EP, Mulliken JB, Greives MR, Teichgraeber JF, Blackwell SJ, Ummer R, Weber R, Chiquet B, Blanton SH, Hecht JT. PBX-WNT-P63-IRF6 pathway in nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res.* 2020 Feb 1;112(3):234-244. doi: 10.1002/bdr2.1630. Epub 2019 Dec 11. PMID: 31825181; PMCID: PMC7325739.

Marazita, Mary L. 2012. “The Evolution of Human Genetic Studies of Cleft Lip and Cleft Palate.” *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 13: 263–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163729>.

Marazita, Mary L., and Mark P. Mooney. 2004. “Current Concepts in the Embryology and Genetics of Cleft Lip and Cleft Palate.” *Clinics in Plastic Surgery* 31 (2): 125–40. [https://doi.org/10.1016/S0094-1298\(03\)00138-X](https://doi.org/10.1016/S0094-1298(03)00138-X).

Martelli, Hercílio, Letícia Viêto Porto, Daniella Reis Barbosa Martelli, Paulo Rogério Ferreti Bonan, Amanda Beatriz Freitas, and Ricardo Della Coletta. 2007. “Prevalence of Nonsyndromic Oral Clefts in a Reference Hospital in the State of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005.” *Brazilian Oral Research* 21 (4): 314–17. <https://doi.org/10.1590/s1806-83242007000400006>.

Martin, E.R. e Chung, R.-H. (2021). Linkage Disequilibrium and Association Analysis. In *Genetic Analysis of Complex Diseases* (eds W.K. Scott and M.D. Ritchie). <https://doi.org/10.1002/9781119104100.ch8>.

Matsui M, Klingensmith J. Multiple tissue-specific requirements for the BMP antagonist Noggin in development of the mammalian craniofacial skeleton. *Dev Biol.* 2014 Aug 15;392(2):168-81. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.06.006. Epub 2014 Jun 17. PMID: 24949938; PMCID: PMC4399715.

McBride, W. A., G. T. McIntyre, K. Carroll, and P. A. Mossey. 2016. “Subphenotyping and Classification of Orofacial Clefts: Need for Orofacial Cleft Subphenotyping Calls for Revised Classification.” *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 53 (5): 539–49. <https://doi.org/10.1597/15-029>.

McKeehan, WL, Wang, F., e Luo, Y. (2009) *Handbook of Cell Signaling*, 2nd Ed., pp. 253–259, Academic/Elsevier Press, New York.

McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev.* 1998 May 15;12(10):1438-52. doi: 10.1101/gad.12.10.1438. PMID: 9585504; PMCID: PMC316831.

Messetti AC, Machado RA, de Oliveira CE, Martelli-Júnior H, de Almeida Reis SR, Moreira HS, Persuhn DC, Wu T, Coletta RD. Brazilian multicenter study of association between polymorphisms in CRISPLD2 and JARID2 and non-syndromic oral clefts. *J Oral Pathol Med.* 2017 Mar;46(3):232-239. doi: 10.1111/jop.12470. Epub 2016 Jun 21. PMID: 27328068.

Minoux M, Antonarakis GS, Kmita M, Duboule D, Rijli FM. Rostral and caudal pharyngeal arches share a common neural crest ground pattern. *Development.* 2009; 136(4): 637-45

Mossey, Peter A., Julian Little, Ron G. Munger, Mike J. Dixon, and William C. Shaw. 2009. "Cleft Lip and Palate." *The Lancet* 374 (9703): 1773–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60695-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60695-4).

Nakatomi M, Ludwig KU, Knapp M, Kist R, Lisgo S, Ohshima H, Mangold E, Peters H. Msx1 deficiency interacts with hypoxia and induces a morphogenetic regulation during mouse lip development. *Development.* 2020 Jun 24;147(21):dev189175. doi: 10.1242/dev.189175. PMID: 32467233.

Nakayama, T, Y Cui, and J L Christian. 2000. "Regulation of BMP / Dpp Signaling during Embryonic Development" 57: 943–56.

Nie X, Luukko K, Kettunen P. BMP signalling in craniofacial development. *Int J Dev Biol.* 2006;50(6):511-21. doi: 10.1387/ijdb.052101xn. PMID: 16741866.

Nunes LM, Pereira AC, Queluz Dde P. Fissuras orais e sua notificação no sistema de informação: análise da Declaração de Nascido Vivo (DNV) em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 1999-2004 [Oral cleft and its notification in the information system: live Births Declaration analysis in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State, 1999-2004]. *Cien Saude Colet.* 2010 Mar;15(2):345-52. Portuguese. doi: 10.1590/S1413-81232010000200009. PMID: 20414600.

Parada, Carolina, and Yang Chai. 2012. "Roles of BMP Signaling Pathway in Lip and Palate Development." *Frontiers of Oral Biology* 16: 60–70. <https://doi.org/10.1159/000337617>.

Paranaíba LM, Bufalino A, Martelli-Júnior 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 Mar;16(2):193-7. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01627.x. Epub 2009 Sep 23. PMID: 19780991.

Paranaíba LM, de Aquino SN, Bufalino A, Martelli-Júnior H, Graner E, Brito LA, e Passos-Bueno MR, Coletta RD, Swerts MS. Contribution of polymorphisms in genes associated with craniofacial development to the risk of nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013 May

1;18(3):e414-20. doi: 10.4317/medoral.18357. PMID: 23524414; PMCID: PMC3668866.

Park-Wyllie L, Mazzotta P, Pastuszak A, Moretti ME, Beique L, Hunnisett L, Friesen MH, Jacobson S, Kasapinovic S, Chang D, Diav-Citrin O, Chitayat D, Nulman I, Einarson TR, Koren G. Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies. *Teratology*. 2000 Dec;62(6):385-92. doi: 10.1002/1096-9926(200012)62:6<385::AID-TERA5>3.0.CO;2-Z. PMID: 11091360.

Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res*. 2009; 42(10): 870-6.

Peng ZY, Tang ZJ, Xie MZ. Research progress in machine learning methods for gene-gene interaction detection. *Yi Chuan*. 2018 Mar 20;40(3):218-226. doi: 10.16288/j.ycz.17-254. PMID: 29576545.

Rafighdoost, Houshang, Mohammad Hashemi, Hiva Danesh, Fatemeh Bizhani, Gholamreza Bahari, and Mohsen Taheri. 2017. "Association of Single Nucleotide Polymorphisms in AXIN2, BMP4, and IRF6 with Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in a Sample of the Southeast Iranian Population." *Journal of Applied Oral Science* 25 (6): 650–56. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0191>.

Rafighdoost, Houshang, Mohammad Hashemi, Hiva Danesh, Fatemeh Bizhani, Gholamreza Bahari, e Mohsen Taheri. 2017. "Association of Single Nucleotide Polymorphisms in AXIN2, BMP4, and IRF6 with Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in a Sample of the Southeast Iranian Population." *Journal of Applied Oral Science* 25 (6): 650–56. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0191>.

Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J*. 2012 Jan;49(1):73-91. doi: 10.1597/10-178. Epub 2011 May 5. PMID: 21545302; PMCID: PMC3437188.

Ren, Y., Feng, J., Liu, Z.-z., Wan, H., Li, J.-h. e Lin, X. (2012), Um novo haplótipo em BMP4 implicado na ossificação do ligamento longitudinal posterior (OPLL) em uma população chinesa. *J. Ortop. Res.*, 30: 748-756. <https://doi.org/10.1002/jor.21586>

Rice R, Spencer-Dene B, Connor EC, Gritli-Linde A, McMahon AP, Dickson C, et al. Disruption of Fgf10/Fgfr2b-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. *J Clin Invest*. 2004; 113(12): 1692-700

Riley, Bridget M., M. Adela Mansilla, Jinghong Ma, Sandra Daack-Hirsch, Brion S. Maher, Lisa M. Raffensperger, Eri Lynn T. Russo, et al. 2007. "Impaired FGF Signaling Contributes to Cleft Lip and Palate." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (11): 4512–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607956104>.

Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*. 2000; 405(6788): 847-56.

Rodrigues, K, M F Sena, A G Roncalli, and Maf Ferreira. 2009. "Prevalence of Orofacial Clefts and Social Factors in Brazil Specialist in Collective Health; Epidemiology." *Braz Oral Res* 23 (1): 38–42.

Rooryck, Caroline, Ingrid Burgelin, Marianne Stef, Laurence Taine, Jean Benoît Thambo, Didier Lacombe, e Benoît Arveiler. 2008. "A 580 Kb Microdeletion in 17q21.32 Associated with Mental Retardation, Microcephaly, Cleft Palate, and Cardiac Malformation." *European Journal of Medical Genetics* 51 (1): 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2007.09.003>.

Sabbagh HJ, Hassan MH, Innes NP, Baik AA, Mossey PA. Parental consanguinity and nonsyndromic orofacial clefts in children: a systematic review and meta-analyses. *Cleft Palate Craniofac J.* 2014 Sep;51(5):501-13. doi: 10.1597/12-209. Epub 2013 May 2. PMID: 23638915.

Saket, Mitra, Kioomars Saliminejad, Koorosh Kamali, Fatemeh Aghakhani Moghadam, Nazanin Esmaeili Anvar, and Hamid Reza Khorram Khorshid. 2016. "BMP2 and BMP4 Variations and Risk of Non-Syndromic Cleft Lip and Palate." *Archives of Oral Biology* 72: 134–37. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.019>.

Salari, Nader. 2021. "Global Prevalence of Cleft Palate , Cleft Lip and Cleft Palate and Lip : A Comprehensive Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of Stomatology Oral and Maxillofacial Surgery* 000: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2021.05.008>.

Savitha, Sathyaprasad, S. M. Sharma, Shetty Veena, and R. Rekha. 2015. "Single Nucleotide Polymorphism of Bone Morphogenetic Protein 4 Gene: A Risk Factor of Non-Syndromic Cleft Lip with or without Palate." *Indian Journal of Plastic Surgery* 48 (2): 159–64. <https://doi.org/10.4103/0970-0358.163053>.

Seelan RS, Mukhopadhyay P, Pisano MM, Greene RM. Developmental epigenetics of the murine secondary palate. *ILAR J.* 2012;53(3-4):240-52. doi: 10.1093/ilar.53.3-4.240. PMID: 23744964; PMCID: PMC4021823.

Sela-Donenfeld D, Kalcheim C. Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development.* 1999 Nov;126(21):4749-62. doi: 10.1242/dev.126.21.4749. PMID: 10518492.

Shkoukani, Mahdi A., Michael Chen, and Angela Vong. 2013. "Cleft Lip - A Comprehensive Review." *Frontiers in Pediatrics* 1 (DEC): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fped.2013.00053>.

Silva, Heglayne Pereira Vital da, Gustavo Henrique de Medeiros Oliveira, Marcela Abbott Galvão Ururahy, João Felipe Bezerra, Karla Simone Costa de Souza, Raul Hernandez Bortolin, André Ducati Luchessi, et al. 2018. "Application of High-Resolution Array Platform for Genome-Wide Copy Number Variation Analysis in Patients with Nonsyndromic Cleft Lip and Palate." *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 32 (6): 1–7. <https://doi.org/10.1002/jcla.22428>.

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

Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classificação das fissuras lábio-palatinas. Sugestão de modificação [Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1972 Jan-Feb;27(1):5-6. Portuguese. PMID: 4671376.

Stanier P, Pauws E. Development of the lip and palate: FGF signalling. *Front Oral Biol.* 2012;16:71-80. doi: 10.1159/000337618. Epub 2012 Jun 25. PMID: 22759671.

Suhl J, Romitti PA, Rocheleau C, Cao Y, Burns TL, Conway K, Bell EM, Stewart P, Langlois P; National Birth Defects Prevention Study. Parental occupational pesticide exposure and nonsyndromic orofacial clefts. *J Occup Environ Hyg.* 2018 Sep;15(9):641-653. doi: 10.1080/15459624.2018.1484127. PMID: 29993348; PMCID: PMC7099602.

Tanoshima M, Kobayashi T, Tanoshima R, Beyene J, Koren G, Ito S. Risks of congenital malformations in offspring exposed to valproic acid in utero: A systematic review and cumulative meta-analysis. *Clin Pharmacol Ther.* 2015 Oct;98(4):417-41. doi: 10.1002/cpt.158. Epub 2015 Aug 10. PMID: 26044279.

Tanoshima M, Kobayashi T, Tanoshima R, Beyene J, Koren G, Ito S. Risks of congenital malformations in offspring exposed to valproic acid in utero: A systematic review and cumulative meta-analysis. *Clin Pharmacol Ther.* 2015 Oct;98(4):417-41. doi: 10.1002/cpt.158. Epub 2015 Aug 10. PMID: 26044279.

Tasanarong P, Pabalan N, Tharabenjasin P, Jarjanazi H. MSX1 gene polymorphisms and non-syndromic cleft lip with or without palate (NSCL/P): A meta-analysis. *Oral Dis.* 2019 Sep;25(6):1492-1501. doi: 10.1111/odi.13127. Epub 2019 Jun 25. PMID: 31132300.

Taub PJ, Silver L. Cleft and Craniofacial Coding in ICD-10. *Cleft Palate Craniofac J.* 2016 May;53(3):e81-3. doi: 10.1597/14-114. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25811764.

van Beynum IM, Kapusta L, Bakker MK, den Heijer M, Blom HJ, de Walle HE. Protective effect of periconceptional folic acid supplements on the risk of congenital heart defects: a registry-based case-control study in the northern Netherlands. *Eur Heart J.* 2010 Feb;31(4):464-71. doi: 10.1093/eurheartj/ehp479. Epub 2009 Dec 1. PMID: 19952004.

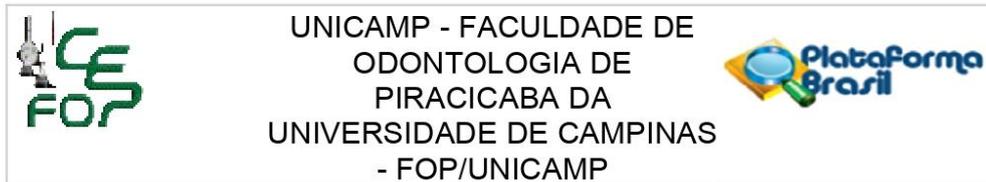
Vastardis, Heleni, Nadeem Karimbux, Symon W. Guthua, J. G. Seidman, e Christine E. Seidman. 1996. "A Human MSX1 Homeodomain Missense Mutation Causes Selective Tooth Agenesis." *Nature Genetics* 13 (4): 417–21. <https://doi.org/10.1038/ng0896-417>.

Viana CS, Machado RA, Persuhn DC, Martelli-Júnior H, Medrado AP, Coletta RD, Reis SRA. Understanding the participation of GREM1 polymorphisms in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res.* 2019 Jan 1;111(1):16-25. doi: 10.1002/bdr2.1405. Epub 2018 Nov 6. PMID: 30402937.

- Viena, Camila Sane, Renato Assis Machado, Darlene Camati Persuhn, Hercílio Martelli-Júnior, Alena Peixoto Medrado, Ricardo D. Coletta, and Silvia R.A. Reis. 2019. "Understanding the Participation of GREM1 Polymorphisms in Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in the Brazilian Population." *Birth Defects Research* 111 (1): 16–25. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1405>.
- Wan, Mei, and Xu Cao. 2005. "BMP Signaling in Skeletal Development." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (3): 651–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.067>.
- Wang, Yusi, Xueyuan Jia, Yuandong Qiao, Lidan Xu, Xuelong Zhang, Qiuyan Li, Ping Wang, Wenjing Sun, and Jie Wu. 2021. "Association Between Nonsyndromic Cleft Lip and Palate and 2 Polymorphic Loci: A Meta-Analysis." *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 58 (6): 763–72. <https://doi.org/10.1177/1055665620962686>.
- Wei Y, Fan T, Yu M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008; 40(4): 278-88.
- Werler MM, Bower C, Payne J, Serna P. Findings on potential teratogens from a case-control study in Western Australia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2003 Dec;43(6):443-7. doi: 10.1046/j.0004-8666.2003.00127.x. PMID: 14712948.
- Wurdak H, Ittner LM, Lang KS, Leveen P, Suter U, Fischer JA, Karlsson S, Born W, Sommer L. Inactivation of TGFbeta signaling in neural crest stem cells leads to multiple defects reminiscent of DiGeorge syndrome. *Genes Dev*. 2005 Mar 1;19(5):530-5. doi: 10.1101/gad.317405. PMID: 15741317; PMCID: PMC551573.
- Yin X, Li J, Li Y, Zou S. Maternal alcohol consumption and oral clefts: a meta-analysis. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2019 Nov;57(9):839-846. doi: 10.1016/j.bjoms.2019.08.013. Epub 2019 Aug 28. PMID: 31473040.
- Zarante I, López MA, Caro A, García-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. doi: 10.1016/j.ijporl.2009.07.012. Epub 2009 Aug 20. PMID: 19699000.

## ANEXOS

### Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Análise de novas variantes genéticas e busca por interações entre genes e genes-fatores ambientais associadas a etiologia das fissuras orais não-sindrômicas

**Pesquisador:** Ricardo Della Coletta

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 4

**CAAE:** 08452819.0.0000.5418

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.678.207

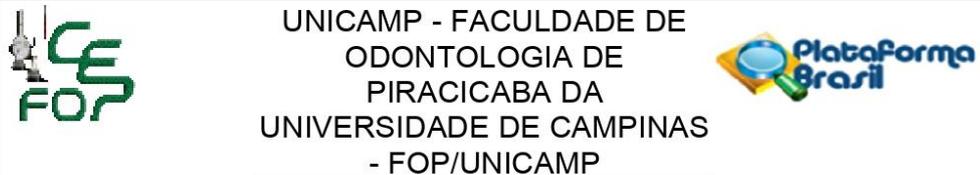
##### Apresentação do Projeto:

O parecer inicial é elaborado com base na transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo na Plataforma Brasil e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. Os pareceres de retorno, emendas e notificações são elaborados a partir dos dados e arquivos da última versão apresentada.

Trata-se de SOLICITAÇÃO DE EMENDA (E1) ao protocolo originalmente aprovado em 29/04/2019 para modificação de inclusão de novo centro coparticipante e inclusão de novos pesquisadores. O parecer foi ajustado de acordo com a documentação apresentada. A descrição detalhada do parecer está ao final do parecer.

A EQUIPE DE PESQUISA citada na capa do projeto de pesquisa inclui, em ordem alfabética, exceto pesquisador responsável, RICARDO DELLA COLETTA (Cirurgião Dentista, Docente Titular do Departamento de Diagnóstico Oral da FOP-UNICAMP, Pesquisador responsável), ANA LÚCIA CARRINHO AYROZA RANGEL (Cirurgiã Dentista, Docente da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE), COSME ALVES DELMIRO (Graduando no curso de Odontologia das Faculdades

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52  
**Bairro:** Areião **CEP:** 13.414-903  
**UF:** SP **Município:** PIRACICABA  
**Telefone:** (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

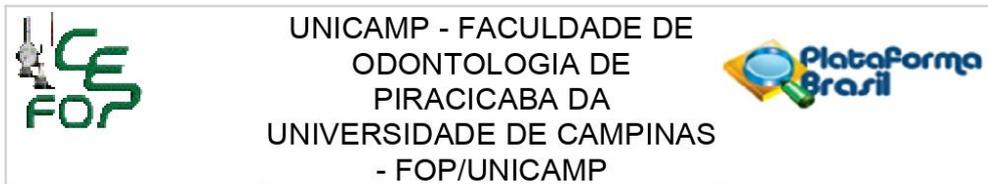


Continuação do Parecer: 4.678.207

Cathedral de Ensino Superior, FACES, Técnico em Saúde Bucal no Hospital da Criança Santo Antônio, Boa Vista – RR), DANIEL CARVALHO (Cirurgião Dentista, Coordenador do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital da Criança Santo Antônio, Boa Vista - RR), DENNIS DINELLY DE SOUZA (Cirurgião Dentista, Cirurgião Bucomaxilofacial no Hospital da Criança Santo Antônio, Boa Vista - RR), HELLEN CAROLLINY DE SOUZA NICOLAU (Graduanda no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, incluída em E1), HERCÍLIOMARTELLI-JÚNIOR (Cirurgião Dentista, Docente Titular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES), LILIANNY QUERINO ROCHA DE OLIVEIRA (Cirurgiã Dentista, Mestranda no PPG em Biologia Bucodental da FOP-UNICAMP, incluída em E1), LUCIMARA TEIXEIRA DAS NEVES (Cirurgiã Dentista, Docente da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB-USP), LUIZ EVARISTO RICCI VOLPATO (Cirurgião Dentista, Docente da Faculdade de Odontologia da Universidade de Cuiabá, incluído em E1), MARÍLIA OLIVEIRA COELHO DUTRA LEAL (Cirurgiã Dentista, Cirurgiã Bucomaxilofacial no Hospital da Criança Santo Antônio, Boa Vista - RR), RAFAELA SCARIOT (Cirurgiã Dentista, Docente da Universidade Positivo - UP), RENATO ASSIS MACHADO (Cirurgião Dentista, Pesquisador de Pós-Doutorado no Departamento de Diagnóstico Oral da FOP-UNICAMP), SÉRGIO TAKASHI KUSSABA (Cirurgião Dentista, Cirurgião Bucomaxilofacial no Hospital da Criança Santo Antônio, Boa Vista - RR) e SILVIA REGINA DE ALMEIDA REIS (Cirurgiã Dentista, Docente da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública) o que é confirmado na declaração dos pesquisadores e na PB.

**DELINEAMENTO DA PESQUISA:** Trata-se de estudo clínico-laboratorial, observacional transversal, que envolverá cerca de 3.720 indivíduos, de oito centros/referência de atenção a pacientes com fissuras orais, sendo os participantes divididos nos grupos Fissura Lábio Palatina Não-Sindrômica, Fissura Labial Não-Sindrômica, Fissura Palatina Não-Sindrômica e Controle, todos submetidos à coleta de saliva para isolamento do material genético e aplicação do questionário. O objetivo geral do presente projeto é identificar e caracterizar variantes genéticas raras e polimórficas que possam contribuir para o risco das FONS na população brasileira, permitindo que tais conhecimentos possam ser aplicados para a prevenção e aconselhamento genético (fundamentados em testes genéticos) e possam no futuro ser úteis em intervenções terapêuticas preventivas. Para alcançar este objetivo, nós compilamos os seguintes objetivos específicos (subprojetos): (i) identificar e selecionar variantes raras e polimórficas [variantes comuns, frequência do alelo menor (MAF) >0,1] por meio de sequenciamento do exoma de pools (pool-seq

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52  
**Bairro:** Areião **CEP:** 13.414-903  
**UF:** SP **Município:** PIRACICABA  
**Telefone:** (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.678.207

Assentimento / Justificativa de Ausência	4TA_Centro_Pro_Sorriso.pdf	14:25:42	Coletta	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Centro_Pro_Sorriso.pdf	22/02/2019 14:25:32	Ricardo Della Coletta	Aceito
Outros	61Anexo_Term_Colab_Coparticipante_ HRAC.pdf	22/02/2019 14:25:03	Ricardo Della Coletta	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	54AltInfra_ProSorriso.pdf	22/02/2019 14:21:39	Ricardo Della Coletta	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	54AltInfra_Apofilab.pdf	22/02/2019 14:21:22	Ricardo Della Coletta	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	54AltInfra_CEAPAC.pdf	22/02/2019 14:21:07	Ricardo Della Coletta	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	54AltInfra_Irma_Dulce.pdf	22/02/2019 14:20:49	Ricardo Della Coletta	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	54AltInfra_CAIF.pdf	22/02/2019 14:20:34	Ricardo Della Coletta	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	54AltInfra_HRAC.pdf	22/02/2019 14:20:19	Ricardo Della Coletta	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PIRACICABA, 28 de Abril de 2021

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**jacks jorge junior**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av.Limeira 901 Caixa Postal 52  
**Bairro:** Areião **CEP:** 13.414-903  
**UF:** SP **Município:** PIRACICABA  
**Telefone:** (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

## Anexo 2 – Relatório de verificação de originalidade e prevenção de plágio

### Mestrado

#### RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

<b>9</b> % ÍNDICE DE SEMELHANÇA	<b>9</b> % FONTES DA INTERNET	<b>4</b> % PUBLICAÇÕES	<b>%</b> DOCUMENTOS DOS ALUNOS
------------------------------------	----------------------------------	---------------------------	-----------------------------------

#### FONTES PRIMÁRIAS

<b>1</b>	<b>repositorio.unicamp.br</b> Fonte da Internet	<b>5</b> %
<b>2</b>	Bibiana Sgorla de Almeida. "Regiões regulatórias transcricionais e pós-transcricionais do gene HLA-G: associação com doenças e com a magnitude de expressão da proteína", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2020 Publicação	<b>&lt;1</b> %
<b>3</b>	<b>qdoc.tips</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>4</b>	<b>mebusca.bc.unicamp.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>5</b>	<b>www.teses.usp.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>6</b>	<b>docplayer.com.br</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>7</b>	<b>teses.usp.br</b> Fonte da Internet	