Camila Bassi Fernandes da Silva

**Investigação do padrão de metilação em
genes ou regiões candidatas à fissura labial
com ou sem palato não-sindrômica (FL/P NS)**

*Investigation of methylation pattern in candidate
genes or regions to non-syndromic cleft lip with or
without palate (CL/P NS)*

São Paulo

2020

Camila Bassi Fernandes da Silva

Investigação do padrão de metilação em genes
ou regiões candidatas à fissura labial com ou
sem palato não-sindrômica (FL/P NS)

*Investigation of methylation pattern in candidate
genes or regions to non-syndromic cleft lip with or
without palate (CL/P NS)*

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Maria Rita
dos Santos e Passos-Bueno

São Paulo

2020

1. Introdução

1.1. Fissuras labiopalatinas

As fissuras labiopalatinas (FLP) são malformações congênitas caracterizadas por falhas na formação do lábio superior (com ou sem envolvimento do palato) ou apenas do palato durante o desenvolvimento embrionário (Marazita, 2012; Leslie & Marazita, 2013).

Os pacientes com FLP podem apresentar limitações na fala, na audição e problemas na formação dos dentes. Além disso, é comum apresentarem dificuldades na comunicação e integração social, uma vez que, como a malformação ocorre na face, é notadamente visível pela sociedade, fazendo com que os indivíduos com FLP tenham dificuldades em se relacionar com outras pessoas e, conseqüentemente, podem apresentar problemas psicossociais (Marazita, 2012; Dixon *et al.*, 2011; Leslie & Marazita, 2013). Foi também observado que indivíduos com FLP têm risco de mortalidade no primeiro ano de vida nove vezes maior do que a população em geral em países em desenvolvimento (Carlson *et al.*, 2013), devido principalmente a dificuldades na alimentação. O tratamento desses pacientes é de custo elevado, estimado em US\$200.000,00 (Berk & Marazita, 2002; Leslie & Marazita, 2013), em que incidem procedimentos cirúrgicos e acompanhamento multidisciplinar que envolve uma equipe de profissionais médicos, geneticistas, fonoaudiólogos, dentistas, nutricionistas e psicólogos (Dixon *et al.*, 2011; Leslie & Marazita, 2013; Stuppia *et al.*, 2011; Mossey *et al.*, 2009). Pelas dificuldades que o paciente enfrenta e pelo custo elevado do tratamento, é importante buscar quais fatores e mecanismos levam a essas malformações, com o intuito de desenvolver estratégias de aconselhamento genético e, principalmente, preventivas.

A malformação do lábio e/ou do palato ocorre ao longo do desenvolvimento da face do embrião. O desenvolvimento craniofacial ocorre entre a 3ª e a 10ª semana de gestação e depende de uma sequência de eventos celulares precisamente coordenados como crescimento, proliferação, migração, transição epitélio-mesenquimal, diferenciação e apoptose. Se houver algum distúrbio em algum desses processos, como

falha no crescimento ou na fusão das estruturas, o feto poderá apresentar fissura do lábio superior e/ou do palato (Figuras 1 e 2) (Leslie & Marazita, 2013; Twigg & Wilkie, 2015).

Os indivíduos com FLP apresentam fenótipos variáveis, podendo apenas ter a falha no lábio superior (unilateral ou bilateral), ou também ter afetadas as regiões dento-alveolar e o palato primário (anterior ao forâmen pré-incisivo) e secundário (posterior ao forâmen pré-incisivo) ou apenas o palato, restrito ao palato secundário (forâmen pós-incisivo) (Schutte & Murray, 1999; Taib *et al.*, 2015) (Figura 3). O tipo de fissura mais comum é a fissura labial unilateral do lado esquerdo (Dixon *et al.*, 2011; Gundlach & Maus, 2006).

Tendo em vista que os processos de diferenciação das estruturas que dão origem ao lábio e ao palato ocorrem em momentos diferentes durante a embriogênese, as FLPs foram separadas em duas classes principais: Fissura do lábio com ou sem fissura do palato (FL/P) e Fissura do palato (FP) (Fogh-Andersen; 1942; Fraser, 1955; Mossey *et al.*, 2009). Além disso, observa-se que não há ocorrência dos dois tipos de fissura (FL/P e FP) em uma mesma família, com raras exceções. Dentre essas exceções, destacam-se as famílias com indivíduos com a Síndrome de Van der Woude (SVW), que é uma condição autossômica dominante causada em geral por mutações de perda de função em heterozigose no gene *IRF6* (Dixon *et al.*, 2011). Dessa forma, para estudos genéticos e aconselhamento, tem sido considerado que, para a maioria dos casos, FL/P e FP têm etiologia distinta.

Figura 1 – Formação da face e do lábio superior. Durante este processo, ocorre a transição epitélío-mesenchimal, em que as células da borda da placa neural, a princípio do tipo epiteliais, passam a possuir um fenótipo migratório e mesenchimal, o que permite seu desprendimento do epitélio e migração, formando a proeminência frontonasal e os arcos faríngeos. O primeiro arco faríngeo origina as proeminências maxilares. A proeminência frontonasal origina os pares de proeminências nasais mediais e nasais laterais. A - Na quinta semana de gestação, a proeminência frontonasal (PFn), as proeminências nasais mediais (PNM), proeminências nasais laterais (PNL) e proeminências maxilares (PMx) já estão formadas. B - Essas estruturas crescem e se reorganizam. C - As PNM e PNL se aproximam e se fundem para iniciar a formação do nariz. D - As proeminências nasais já fundidas se aproximam das PMx. E - Inicia-se a fusão das proeminências nasais e das PMx. F - O lábio superior e o palato primário se formam, então, na décima semana de gestação. G - Se houver algum distúrbio, poderá não ocorrer essa fusão, formando a fissura do lábio superior (Adaptado de <http://www.indiana.edu/~anat550/hnanim/face/face.html>) (Jiang *et al.*, 2006).

Figura 2 - Formação do palato secundário. A e B - Lâminas palatinas dispostas verticalmente e paralelas, separadas pela língua, na sexta semana de gestação. Corte longitudinal (A) e Corte transversal/Vista ventro-dorsal (B). C e D - As lâminas palatinas crescem e se elevam em uma posição horizontal, enquanto a língua desce. Corte longitudinal (C) e Corte transversal/Vista ventro-dorsal (D). E e F - As lâminas palatinas se fundem, formando o palato secundário, permitindo uma separação entre cavidade oral e nasal. Corte longitudinal (E) e Corte transversal/Vista ventro-dorsal (F) (Adaptado de <http://www.indiana.edu/~anat550/hnanim/face/face.html>) (Gritli-Linde, 2007).

Figura 3 - Variabilidade fenotípica da FLP. A - Fissura labial unilateral. B - Fissura labial bilateral. C - Fissura labial e palatina unilateral. D - Fissura labial e palatina bilateral. E - Fissura palatina. F - Vista ventro-dorsal do interior bucal (Adaptado de Brito *et al.*, 2012b).

A frequência da FL/P varia de acordo com a população. Em africanos, é de cerca de 1 em cada 2.500 nascimentos, sendo a mais baixa do mundo, em europeus é de cerca de 1:1.000 e em Asiáticos e em Ameríndios é de cerca de 2 a cada 1.000 nascimentos, sendo a mais alta (Dixon *et al.*, 2011; Marazita, 2012; Taib *et al.*, 2015). No Brasil, varia de 0.28 a 1.54 a cada 1000 nascimentos (Menegotto & Salzano, 1991; Loffredo *et al.*, 2001, Rodrigues *et al.*, 2009). A FP apresenta uma incidência racial uniforme de 0.5:1000 nascimentos (Taib *et al.*, 2015). Observa-se um aumento da prevalência de FL/P em populações com baixo nível socioeconômico (Dixon *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 1997) e diferenças na prevalência de acordo com o sexo, sendo FL/P mais prevalente no sexo masculino e FP, no sexo feminino, em diversos grupos étnicos (Mossey *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 1997).

Historicamente, as FL/Ps têm sido maior foco de estudos do que FP, possivelmente devido ao maior número de casos e maior facilidade de identificação (Marazita, 2012; Dixon *et al.*, 2011), sendo também as FL/Ps o foco deste trabalho. Dessa forma, os próximos tópicos serão focados nesse grupo de fissura.

1.2. Fatores genéticos da fissura do lábio com ou sem fissura do palato (FL/P)

A fissura do lábio com ou sem fissura do palato (FL/P) pode ser síndrômica, ou seja, pode estar associada a outras alterações clínicas, ou não-síndrômica, em que a fissura se apresenta como fenótipo isolado.

1.2.1. FL/Ps síndrômicas

As FL/Ps síndrômicas representam 30% dos casos de FL/P, sendo caracterizadas pela presença da fissura do lábio com ou sem palato associada a outras alterações clínicas (Leslie & Marazita, 2013; Jugessur *et al.*, 2009). Podem ocorrer devido a alterações cromossômicas, como deleções, duplicações ou trissomias, ou devido a alterações monogênicas (Stuppia *et al.*, 2011; Mitchell, 2002), como por exemplo a SVW e a Síndrome do pterígeo poplíteo (PPS), ambas causadas por mutações no gene *IRF6* (*Interferon Regulatory Receptor 6*) (Kondo *et al.*, 2002). Tais síndromes apresentam fenótipos adicionais, além da fissura. A SVW é caracterizada pela presença de fossetas no lábio inferior e da fissura do lábio e/ou do palato, enquanto que a PPS é caracterizada

por anomalias cutâneas, musculoesqueléticas e genitais, além da fissura do lábio e/ou do palato (Stuppia *et al.*, 2011).

A identificação de mutações nas formas sindrômicas tem contribuído para a compreensão da etiologia das formas não-sindrômicas (Stanier & Moore, 2004), podendo diferentes variantes no mesmo gene estarem atuando nas duas formas, como por exemplo, variantes genéticas raras (variantes com frequência menor que 1%) sem sentido e do tipo não-sinônima no gene *IRF6* são causativas de SVW e variantes comuns (variantes com frequência maior que 1%) na região promotora desse mesmo gene são de susceptibilidade às FL/P não-sindrômicas (Kondo *et al.*, 2002; Zuccherro *et al.*, 2004; Beaty *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2012c; Paranaíba *et al.*, 2008).

1.2.2. FL/Ps não-sindrômicas

As FL/Ps não-sindrômicas representam os casos de fissura do lábio com ou sem palato, sem outras alterações clínicas associadas, e correspondem a cerca de 70% dos casos (Jugessur *et al.*, 2009; Zuccherro *et al.*, 2004).

A observação de que há pelo menos 2 pacientes com fissura labial com ou sem fissura do palato não sindrômica (FL/P NS) em uma mesma família em 20-30% dos casos (Marazita, 2012; Grosen *et al.*, 2010), a maior concordância de FL/P entre gêmeos monozigóticos (40-60%) do que em dizigóticos (3-5%) na Dinamarca (Jugessur *et al.*, 2009; Christensen & Fogh-Andersen, 1993) e uma estimativa alta da herdabilidade, sendo na população brasileira de 45 a 85% (Brito *et al.*, 2011), são fortes evidências de que a ocorrência da FL/P NS depende de uma contribuição genética.

Com base nessas evidências, tem-se sugerido que, na maioria dos casos, o modelo genético mais provável da FL/P NS é o de herança multifatorial (Grosen *et al.*, 2010; Dixon *et al.*, 2011). O padrão de herança multifatorial depende dos fatores genéticos associados a fatores ambientais, atuando durante a embriogênese, para a manifestação da doença. Como exemplos de fatores ambientais, foi observada uma proporção maior de mães que fizeram uso de álcool, cigarro e/ou tiveram deficiência de ácido fólico durante a gravidez que tiveram filhos afetados do que em mães que não utilizaram essas substâncias (Kelly *et al.*, 2012; Crossan & Duane, 2018; Xu *et al.*, 2018,

Wilcox *et al.*, 2007). Contudo, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação de tais fatores e como esses interagem com os fatores genéticos de predisposição.

O modelo de herança multifatorial é o de limiar de predisposição (Falconer, 1965; Mitchell, 2002). Neste modelo, os indivíduos com a doença multifatorial apresentam um acúmulo de alelos de risco, os quais são alelos comuns (variantes presentes em mais que 1-5% da população) e de efeito baixo na determinação do fenótipo. Dessa forma, a manifestação da doença depende de ultrapassar esse limiar. Os indivíduos da população que não atingem esse limiar são clinicamente normais (Falconer, 1965; Manolio *et al.*, 2009).

O método que mais tem sido utilizada para estudar as variantes comuns de risco é o *Genome-Wide Association Study* (GWAS), que parte do princípio que a doença comum é causada por um acúmulo de variantes de pequeno efeito e frequentes na população, isto é, “doença comum, variante comum” (Reich & Lander, 2001; Schork *et al.*, 2009), que correspondem às mesmas variantes no modelo de limiar de predisposição acima citado. O GWAS não necessita de conhecimento prévio dos genes que serão incluídos no estudo (Kruglyak, 2008).

Um exemplo de variante comum que foi identificado por estudos de GWAS e que confere risco em pacientes com FL/P NS é a variante de base única ou SNV (do inglês *Single-Nucleotide Variation*) rs957525 C>A na posição 130015336 da região 8q24.21, que é uma região de deserto gênico (Birnbaum *et al.*, 2009). A associação entre esse SNV e FL/P foi replicada em várias populações, incluindo a brasileira (Brito *et al.*, 2012a).

Além da região 8q24.21, estudos de GWAS detectaram outras regiões associadas à FL/P NS como 1p22.1 e 20q12 nas populações europeia e asiática (Beatty *et al.*, 2010) e 2p24.2, 4p16.2, 5p12, 8p11.23, 17q23, 19q13, entre outras, em estudos multi-étnicos (Leslie *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2017). Já foram confirmadas na população brasileira variantes comuns em 8q24.21, 2p24.2 e 1p22.1 (Brito *et al.*, 2012a; Machado *et al.*, 2018, Bagordakis *et al.*, 2013).

Entretanto, as variantes encontradas até o momento por GWAS não são suficientes para explicar a alta herdabilidade das FL/Ps, o que tem sido chamado de

“herdabilidade perdida”. Uma hipótese é que as variantes que provavelmente não estão sendo detectadas sejam variantes de efeito médio ou grande que, por serem deletérias, são frequentemente removidas pela seleção natural e, conseqüentemente, tornam-se raras na população.

A principal metodologia que tem sido usada para a identificação e estudo das variantes raras é o sequenciamento de nova geração (NGS), dentre elas, a análise de sequenciamento completo de exoma (SCE). Esta técnica busca por mutações na região codificante do genoma, local em que se espera que se tenha uma conservação maior da sequência de nucleotídeos. Logo, se houver alterações nessa região, espera-se que seja de grande ou médio efeito para o organismo (Tetreault *et al.*, 2015).

Um exemplo bem-sucedido de aplicação de SCE por NGS é a identificação de mutações raras no gene *CDH1* em casos familiares de FL/P NS. O *CDH1* (*Cadherin 1*) codifica caderina epitelial que promove adesão celular entre células epiteliais vizinhas e é superexpresso durante estágios críticos do desenvolvimento do lábio e do palato (Frebours *et al.*, 2006). Brito *et al.* (2015) encontrou variantes do tipo *missense*, *stopgain* e *splicing* em *CDH1* em pacientes brasileiros. Nessas famílias, a segregação da FL/P é compatível com o padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta, em que as variantes se encontram no estado heterozigoto. A penetrância incompleta, que foi estimada em menos de 50%, sugere que outros fatores genéticos ou ambientais são necessários. Esses casos também podem representar um modelo de herança oligogênica.

Além de mutações em *CDH1*, por meio da análise de SCE, foram detectadas variantes raras que contribuem para a etiologia das FL/Ps NS, em outros genes, como por exemplo, variantes de perda de função no gene *ARHGAP29* em pacientes filipinos, americanos, indianos, ingleses e brasileiros (Leslie *et al.*, 2012; Chandrasekharan & Ramanathan, 2014; Savastano *et al.*, 2017). Também foram encontradas em amostras multiétnicas, variantes do tipo *missense*, *stopgain*, *nonsense* e de *splicing* no gene *CTNND1* e do tipo *missense* nos genes *PLEKHA5*, *PLEKHA7* e *ESRP2* (Cox *et al.*, 2018) e *frameshift insertion* em *TP63* (Basha *et al.*, 2018).

Identificar variantes raras de efeito médio ou grande bem como aquelas de efeito pequeno é fundamental para a caracterização da arquitetura genética associada às FL/Ps, bem como para o aconselhamento genético. Nos casos de variante rara de efeito médio ou de grande, o risco de novos afetados nessas famílias tende a ser bem maior do que nas famílias em que segregam variantes de efeito pequeno. As variantes raras poderiam explicar a alta recorrência de afetados em algumas famílias. Entretanto, há dificuldades na priorização dessas variantes, pois, no caso de variantes ainda não descritas, não sabemos se elas são, de fato, patogênicas e, quando o gene nunca havia sido antes associado a doença, há a necessidade de replicação de dados e realização de estudos funcionais.

Caso as variantes não sejam detectadas por meio de SCE, um dos motivos pode ser devido à presença de mais de uma variante estar segregando em uma família (heterogeneidade genética). Outro motivo poderia ser por esse tipo de sequenciamento (SCE) cobrir apenas as regiões exônicas e muitas variantes de risco para FL/P podem estar localizadas na região não-codificadora. Um método possível para testar essa hipótese seria o sequenciamento completo do genoma, o que ainda tem um custo relativamente elevado. Um método alternativo no estudo de casos familiares que cobre também as regiões intrônicas é o estudo de ligação, que se baseia na co-segregação do loco genético associado com a doença entre os afetados da família (Marazita *et al.*, 2004). Nesses casos, quanto maior o número de indivíduos da família maior a chance de identificar a região que possa estar ligada a doença (Manolio *et al.*, 2009). O estudo de ligação já foi bastante utilizado na busca de candidatos para FL/P NS em famílias com alta recorrência de afetados antes da técnica de SCE, o qual revelou as seguintes regiões candidatas: 1q32, 2p13, 3q27-28, 9q21, 14q21-24 e 16q24 (Marazita *et al.*, 2004). Entretanto, nenhuma variante foi confirmada ainda nessas regiões.

1.3. Epigenética

Pesquisadores acreditam que uma das formas que os fatores ambientais podem influenciar na expressão gênica dos indivíduos seja por meio de modificações químicas na molécula de DNA ou em histonas, sem a alteração da sequência do DNA, ou seja, alterando o padrão epigenético (Tammen *et al.*, 2013; Jaenish & Bird, 2003).

Um experimento clássico que exemplifica tal afirmação está relacionado com a cor de pelagem da prole de camundongo conforme a alimentação materna. A fêmea gestante pode ter uma prole com a cor de pelagem que pode ser amarela, pseudo-aguti ou mosaico, mas quando a mesma fêmea é exposta a suplementos maternos ou compostos tóxicos, a cor da pelagem de sua prole é, em sua maioria, amarela ou pseudo-aguti, respectivamente. A explicação para esses fenótipos é que há um sítio próximo à região promotora do gene que determina a cor de pelagem que, se estiver hipermetilado (influenciado no experimento pela presença de compostos tóxicos), o fenótipo do camundongo será pseudo-aguti e, se estiver hipometilado (influenciado pela exposição aos suplementos maternos), a cor da pelagem será amarela (Feil & Fraga, 2012).

As alterações epigenéticas são um mecanismo dinâmico e natural da regulação gênica que ocorrem ao longo da vida, a depender do hábito de vida e do ambiente social que o indivíduo vive, ou podem ser herdadas por mitose ou meiose. Um exemplo conhecido de herança epigenética é o processo de inativação do cromossomo X (Feil & Fraga, 2012; Tammen *et al.*, 2013; Calvanese *et al.*, 2009; Skvortsova *et al.*, 2019). Uma vez que cada tecido expressa os genes de diferentes formas e o organismo passa por alterações ao longo da vida, o padrão de metilação é variável para tecidos diferentes de um mesmo organismo (Masser *et al.*, 2013) e de acordo com a idade da pessoa (Tammen *et al.*, 2013; Calvanese *et al.*, 2009).

A molécula de DNA pode apresentar alteração do padrão epigenético por meio da metilação, isto é, pela inserção do grupo metila no carbono 5' do nucleotídeo citosina que estiver localizada em ilhas CpG (citosina-fosfato-guanina). As ilhas CpG são regiões densas em citosinas e guaninas e normalmente estão associadas a regiões promotoras do gene. Devido à sua localização e ao recrutamento de proteínas que se associam às citosinas metiladas, se ocorrer uma hipermetilação nessa região, o promotor em geral se tornará inacessível e, consequentemente, não será transcrito. Dessa forma, ocorrerá a inativação do gene (Tammen *et al.*, 2013; Masser *et al.*, 2013; Calvanese *et al.*, 2009; Horsburgh *et al.*, 2015). Também já foi observado que a metilação de DNA pode ativar a transcrição do gene, possivelmente porque, ao se ligar ao promotor, evita a ligação de proteínas repressoras, permitindo a sua transcrição (Halpern *et al.*, 2014).

As modificações químicas também podem ocorrer nas histonas, proteínas que compactam ou descompactam o DNA, encobrindo ou expondo o gene, respectivamente e, conseqüentemente, alterando sua expressão gênica. Alguns exemplos de modificações são a acetilação ou metilação. A acetilação é a inserção do grupo acetila nos aminoácidos lisina e arginina, que leva à ativação do gene pela neutralização de cargas positivas dos aminoácidos, diminuindo a atração entre as histonas, e a metilação é a inserção do grupo metila em aminoácidos que, dependendo da histona metilada, pode levar à ativação ou à inativação do gene pelo recrutamento de proteínas para a cromatina (Horsburgh *et al.*, 2015; Mochizuki *et al.*, 2018).

1.4. Fatores Genéticos X Epigenética nas FL/Ps NS

Mais recentemente, pesquisadores vêm estudando se a alteração epigenética, influenciada por fatores externos, tem alguma participação na alteração do risco de doenças, sendo o câncer a doença mais estudada (Skvortsova *et al.*, 2019).

Foi observado que alguns pacientes com câncer gástrico difuso possuíam mutação em um dos alelos do gene *CDH1*, mesmo gene que apresenta variantes de perda de função causativas para FL/P NS. Existem, inclusive, alguns trabalhos que relatam casos de FL/P e câncer gástrico difuso na mesma família com variantes patogênicas em *CDH1* (Frebourg *et al.*, 2006; Benusiglio *et al.*, 2013). Em alguns casos de câncer gástrico difuso, foi observado que indivíduos heterozigotos apresentavam a doença. Ao verificarem o promotor do *CDH1* nestes pacientes, foi encontrada uma hipermetilação, que levava a um silenciamento do gene. Dessa forma, a explicação proposta foi que o modelo desta doença era de 2 *hits*. O primeiro *hit* seria, então, a variante patogênica na linhagem germinativa em um dos alelos de *CDH1* e o segundo *hit*, a hipermetilação do outro alelo (Grady *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2001).

O mesmo mecanismo foi sugerido e testado em pacientes com FL/P NS com mutação em *CDH1* que, de forma semelhante ao câncer gástrico difuso, tem padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta (Brito *et al.*, 2015; Alvizi *et al.*, 2017). Foi verificado que os pacientes exibiam um nível de metilação no promotor do gene significativamente superior aos não-penetrantes com variante patogênica em

CDH1 e aos controles (Figura 4). Dessa forma, foi proposto que, além da variante patogênica rara no gene *CDH1*, é necessário um segundo *hit* para que a FL/P se manifeste, como por exemplo, a metilação ou silenciamento do promotor deste gene. A não ocorrência deste silenciamento, que representaria um segundo *hit*, poderia explicar os casos de penetrância incompleta (Brito *et al.*, 2015; Alvizi *et al.*, 2017).

Figura 4 - Porcentagens de metilação de pacientes (AF), familiares não-penetrantes (NP) e controles da população (NC). A variante patogênica em *CDH1* foi observada nos familiares afetados e nos não-penetrantes (Alvizi *et al.*, 2017).

Alvizi *et al.* (2017) também observou, a partir de análise de metiloma, um padrão de metilação distinto e enriquecido em regiões potencialmente regulatórias e ativas no genoma e em regiões candidatas, especialmente em genes da via de transição epitélio-mesenquimal e da via Wnt, em pacientes com FL/P NS comparado aos controles na população brasileira. Além disso, o mesmo trabalho encontrou uma correlação entre os níveis de metilação de tecido de lábio e de sangue, o que indica que o sangue pode ser utilizado para estudo de análise de metilação para FL/P.

Em comparação de níveis de metilação entre pacientes com vários subtipos de FLP (fissura do lábio, fissura do palato e fissura do lábio e do palato), foi observado que o padrão de metilação era similar entre os pacientes com fissura de lábio e fissura de

lábio e do palato (as FL/Ps) e ambos eram diferentes de fissura do palato (FP), o que corrobora com a diferença de etiologia de FL/P e FP (Sharp *et al.*, 2017).

Gonseth *et al.* (2019) observou uma tendência à hipometilação em todo o epigenoma de pacientes com FL/P próximos a regiões ativas e a genes previamente associados a FL/P. O estudo foi realizado em amostras de pacientes anteriores a fortificação obrigatória de folato na dieta nos Estados Unidos. Dessa forma, o trabalho sugeriu que a hipometilação pode ser devido a uma quantidade baixa de doadores do grupo metila, resultante da deficiência de folato, e que alterações na metilação de loci epigenômicos sensíveis à nutrição poderiam explicar o mecanismo pelo qual o risco de FL/P é responsivo a suplementação materna de folato.

Tais trabalhos têm demonstrado a importância do estudo de metilação em pacientes com FL/P NS.

1.5. Hipóteses do presente trabalho

Diante da revisão da bibliografia exposta acima, apesar das variantes raras serem um mecanismo promissor para explicar a arquitetura genética das FL/P NS, uma das limitações importantes é a priorização das variantes de genes candidatos, particularmente aqueles com pouca evidência de poderem estar associadas a essa malformação, ou seja, aquelas variantes em genes candidatos novos, nunca antes sugeridos como associados à FL/P. Uma outra limitação é identificar variantes patogênicas do tipo *missense* e sinônimas. Apesar dos vários programas de predição *in silico*, na maioria das vezes são necessários estudos funcionais, o que é inviável dado o grande número de possíveis variantes patogênicas observadas nos estudos genômicos. Tendo em vista que os casos de FL/P NS com padrão de herança compatível com o autossômico dominante, na sua grande maioria, tem penetrância incompleta, tem-se sugerido que é necessário mais um evento (genético ou epigenético) para a manifestação do quadro clínico, como sugerimos em nosso estudo preliminar (Alvizi *et al.*, 2017), onde observamos que o padrão de metilação da região promotora no *CDH1* dos afetados heterozigotos para variante patogênica em *CDH1* é maior do que nos

indivíduos heterozigotos com a mesma variante, mas sem manifestação clínica, ou nos controles (sem variante patogênica em *CDH1* e clinicamente normais).

Diante desses achados, a hipótese principal desse trabalho é que genes ou regiões candidatas à FL/P NS têm maior probabilidade de terem alteração no padrão de metilação nos afetados do que em não-afetados.

6. Conclusões

Com base em tais resultados, podemos concluir que:

- a) *TP63* e *ROR2* estão mais frequentemente com alteração de metilação nos pacientes do que nos controles. Esses resultados sugerem pela 1ª vez, que a metilação nesses genes podem ser um fator de risco para FL/P NS. Entretanto, não sabemos se esse padrão de metilação está associado aos fatores de risco genético sugeridos para essas famílias.
- b) Os genes candidatos selecionados, incluindo o gene *ARGHAP29*, que já é associado à FL/P, não apresentaram alteração do padrão de metilação. Esses resultados podem ser decorrentes do pequeno tamanho amostral e/ou que, exceto pelas variantes em *ARGHAP29*, as variantes selecionadas como de risco representam falsos positivos, ou ainda, que a alteração de metilação em genes de risco para FL/P não seja comum.
- c) O estudo de ligação combinado com estudo de metilação em uma das famílias sugeriu uma nova região de risco para FL/P NS, que inclui o gene *DCHS2*.

7. Resumo

As fissuras labiopalatinas não sindrômicas (FL/P NS) são malformações congênitas que afetam o lábio e/ou o palato. O padrão de herança sugerido para as FL/P NS é o de herança multifatorial. Um dos modelos genéticos mais testados é aquele em que os pacientes apresentam um acúmulo de variantes de baixo risco e frequentes na população. Entretanto, apenas essas variantes não explicam a alta herdabilidade da doença. Foi sugerido, então, que variantes raras de efeito médio e grande estejam atuando na predisposição à FL/P NS, entretanto, a identificação dessas variantes representam um grande desafio. Uma vez que apenas a contribuição genética não explica o fenótipo, tem-se sugerido que a alteração do padrão epigenético possa estar influenciando no quadro clínico dos pacientes. Alguns trabalhos observaram que há alteração de metilação no promotor de genes candidatos em pacientes com FL/P NS, dentre eles, o gene *CDH1*. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi verificar se os genes selecionados como possíveis causas para FL/P NS têm maior probabilidade de terem alteração no padrão de metilação nos afetados de famílias multiplex do que em não-afetados, o que poderia adicionar evidências de que os genes estejam contribuindo para o fenótipo. Foram estudados o padrão de metilação da região promotora (região global e por sítio) de 16 novos genes candidatos e de 4 genes já associados às FL/Ps (*ARHGAP29*, *SHH*, *TP63* e *ROR2*) em uma casuística brasileira de 28 afetados e 71 controles. Foi observada hipermetilação no gene *TP63* (p-valor=0.025 na análise por região) e hipometilação em *ROR2* (p-valores=0.045, 0.008, 0.043 e 0,0015 em 4 sítios dentro da região CpG). Ambos os genes estão envolvidos na sinalização da via Wnt que, quando desregulada, pode ser um fator de risco para FL/P. Também foi encontrada no presente trabalho uma nova região de risco candidata para FL/P NS, baseado em estudo de ligação, genômica e análise epigenética. *DCHS2*, o melhor candidato dessa região, tem participação na via PCP, o que torna essa região ainda mais promissora. Tais resultados sugerem que a alteração do padrão epigenético nesses genes pode estar influenciando no quadro clínico nas FL/Ps; porém esse estudo não contribuiu para uma melhor classificação da maioria dos novos genes candidatos, o que pode ter sido por limitações do tamanho amostral e metodologia.

Palavras-chave: Fissura labial com ou sem fissura do palato não-sindrômica, FL/P NS, epigenética, metilação, CpG, *TP63*, *ROR2*, *DCHS2*.

8. Abstract

Non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) are congenital malformations that affect the lip and/or palate. Multifactorial is the most likely inheritance pattern for NSCL/P. Accumulation of low risk and frequent variants has been the most tested model in genomic studies. However, just the presence of these variants does not explain the high heritability of the disease. Rare variants of medium and large effects have been suggested as another possible model to be acting on NSCL/P predisposition, however, identification of these variants represents a great challenge. Changes in the epigenetic pattern may be influencing the clinical condition of patients in addition to genetic alterations. In this regard, methylation alterations in the promoter region of candidate genes in patients with NSCL/P, including *CDH1*, have been shown by some authors. Thus, the aim of the present study was to verify if novel candidate genes for NSCL/P selected from genomic studies are more likely to have changes in the methylation pattern in affected individuals from multiplex families than in non-affected ones, which could add more evidences that these genes are good FL/P candidates. We studied the methylation pattern of the promoter region (global region and by site) of 16 novel candidate genes and 4 genes that are already associated with CL/P (*ARHGAP29*, *SHH*, *TP63* e *ROR2*) on a Brazilian cohort of 28 affected individuals and 71 controls. It was observed hypermethylation on *TP63* gene (p-value=0.025 on analysis by region) and hypomethylation on *ROR2* (p-values=0.045, 0.008, 0.043 and 0.0015 on 4 sites within the CpG region). Both genes are involved in Wnt signalization pathway, which when disrupted, can be a risk factor for CL/P. A new candidate risk region for NSCL/P, based on linkage, genomic and epigenetic analysis, was also found in this study. *DCHS2*, the best candidate gene within this region, participates in PCP pathway, which makes this candidate region even more promising. In conclusion, such results suggest that the alteration of the epigenetic pattern in these genes may be influencing the clinical condition observed in NSCL/Ps; however, our study did not contribute in adding more evidence about the pathogenicity status of the prioritized novel candidate variants and genes, which can be due to our limited sample size and methodology.

Keywords: Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, NSCL/P, epigenetics, methylation, CpG, *TP63*, *ROR2*, *DCHS2*.

9. Referências Bibliográficas

Alvizi L, Ke X, Brito LA, *et al.*, 2017. Differential methylation is associated with non-syndromic cleft lip and palate and contributes to penetrance effects. *Scientific Reports*, 7(1):2441.

Bagordakis E, Paranaíba LMR, Brito LA, *et al.*, 2013. Polymorphisms at regions 1p22.1 (rs560426) and 8q24 (rs1530300) are risk markers for nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 161A(5):1177–1180.

Bahar Halpern K, Vana T & Walker MD, 2014. Paradoxical role of DNA methylation in activation of FoxA2 gene expression during endoderm development. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(34):23882–23892.

Basha M, Demeer B, Revencu N, *et al.*, 2018. Whole exome sequencing identifies mutations in 10% of patients with familial non-syndromic cleft lip and/or palate in genes mutated in well-known syndromes. *Journal of Medical Genetics*, 55(7):449–458.

Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, *et al.*, 2010. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nature Genetics*, 42(6):525–529.

Benusiglio PR, Caron O, Consolino E, *et al.*, 2013. Cleft lip, cleft palate, hereditary diffuse gastric cancer and germline mutations in CDH1. *International Journal of Cancer*, 132(10):2470.

Bergman D, Halje M, Nordin M & Engström W, 2013. Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review. *Gerontology*, 59(3):240–249.

Berk, NW, Marazita, ML, 2002. The Costs of Cleft Lip and Palate: Personal and Societal Implications. In: Wyszynski, DF., editor. *Cleft Lip and Palate: From Origin to Treatment*. Oxford: Oxford University Press.

Bernstein KA, Gangloff S & Rothstein R, 2010. The RecQ DNA helicases in DNA repair. *Annual Review of Genetics*, 44:393–417.

Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, *et al.*, 2009. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nature Genetics*, 41(4):473–477.

Blake JA & Ziman MR, 2014. Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development*, 141(4):737–751.

Botti E, Spallone G, Moretti F, *et al.*, 2011. Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33):13710–13715.

Breuer K, Foroushani AK, Laird MR, *et al.*, 2013. InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond--recent updates and continuing curation. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue):D1228-33.

Brito LA, 2016. Exome analysis in multiplex families reveals novel candidate genes for nonsyndromic cleft lip / palate. Tese de doutorado. 29-60.

Brito LA, Cruz LA, Rocha KM, *et al.*, 2011. Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 155A(7):1581–1587.

Brito LA, Paranaíba LMR, Bassi CFS, *et al.*, 2012a. Region 8q24 is a susceptibility locus for nonsyndromic oral clefting in Brazil. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 158A(9):2170–2175.

Brito LA, Meira JGC, Kobayashi GS & Passos-Bueno MR, 2012b. Genetics and management of the patient with orofacial cleft. *Plastic surgery international*, 2012:782821.

Brito LA, Bassi CF, Massotti C, *et al.*, 2012c. *IRF6* is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian Population. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 94(6):464–468.

Brito LA, Yamamoto GL, Melo S, *et al.*, 2015. Rare Variants in the Epithelial Cadherin Gene Underlying the Genetic Etiology of Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate. *Human Mutation*, 36(11):1029–1033.

Calvanese V, Lara E, Kahn A & Fraga MF, 2009. The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, 8(4):268–276.

Carlson L, Hatcher KW & Vander Burg R, 2013. Elevated infant mortality rates among oral cleft and isolated oral cleft cases: a meta-analysis of studies from 1943 to 2010. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 50(1):2–12.

Chandrasekharan D & Ramanathan A, 2014. Identification of a novel heterozygous truncation mutation in exon 1 of ARHGAP29 in an Indian subject with nonsyndromic cleft lip with cleft palate. *European journal of dentistry*, 8(4):528–532.

Chiquet BT, Blanton SH, Burt A, *et al.*, 2008. Variation in WNT genes is associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Human Molecular Genetics*, 17(14):2212–2218.

Christensen K & Fogh-Andersen P, 1993. Cleft lip (+/- cleft palate) in Danish twins, 1970-1990. *American Journal of Medical Genetics*, 47(6):910–916.

Cox LL, Cox TC, Moreno Uribe LM, *et al.*, 2018. Mutations in the Epithelial Cadherin-p120-Catenin Complex Cause Mendelian Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate. *American Journal of Human Genetics*, 102(6):1143–1157.

Crossan E & Duane B, 2018. Is there an association between maternal smoking and oral clefts? *Evidence-based dentistry*, 19(1):24–25.

De Calisto J, Araya C, Marchant L, Riaz CF & Mayor R, 2005. Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development*, 132(11):2587–2597.

Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH & Murray JC, 2011. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews. Genetics*, 12(3):167–178.

Falconer DS, 1965. The inheritance of liability to certain diseases, estimated from the incidence among relatives. *Annals of Human Genetics*, 29(1):51–76.

Faria LA, 2019. Non-syndromic orofacial clefts: enrichment of rare loss-of-functions variants in genes under selective constraint. Tese de doutorado. 21-62.

Feil R & Fraga MF, 2012. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews. Genetics*, 13(2):97–109.

Ferretti E, Li B, Zewdu R, *et al.*, 2011. A conserved Pbx-Wnt-p63-Irf6 regulatory module controls face morphogenesis by promoting epithelial apoptosis. *Developmental Cell*, 21(4):627–641.

Fogh-Andersen P, 1942. *Inheritance of Harelip and Cleft Palate*. Munksgaard.

Fraser FC, 1955. Thoughts on the etiology of clefts of the palate and lip. *Acta genetica et statistica medica*, 5(4):358–369.

Frebourg T, Oliveira C, Hochain P, *et al.*, 2006. Cleft lip/palate and CDH1/E-cadherin mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *Journal of Medical Genetics*, 43(2):138–142.

Fuentes Fajardo KV, Adams D, NISC Comparative Sequencing Program, *et al.*, 2012. Detecting false-positive signals in exome sequencing. *Human Mutation*, 33(4):609–613.

Gonseth S, Shaw GM, Roy R, *et al.*, 2019. Epigenomic profiling of newborns with isolated orofacial clefts reveals widespread DNA methylation changes and implicates metastable epiallele regions in disease risk. *Epigenetics*, 14(2):198–213.

Grady WM, Willis J, Guilford PJ, *et al.*, 2000. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nature Genetics*, 26(1):16–17.

Gritli-Linde A, 2007. Molecular control of secondary palate development. *Developmental Biology*, 301(2):309–326.

Grosen D, Chevrier C, Skytthe A, *et al.*, 2010. 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. *Journal of Medical Genetics*, 47(3):162–168.

Gundlach KKH & Maus C, 2006. Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world-wide. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 34 Suppl 2:1–2.

- Horsburgh S, Robson-Ansley P, Adams R & Smith C, 2015. Exercise and inflammation-related epigenetic modifications: focus on DNA methylation. *Exercise Immunology Review*, 21:26–41.
- Howe LJ, Richardson TG, Arathimos R, *et al.*, 2019. Evidence for DNA methylation mediating genetic liability to non-syndromic cleft lip/palate. *Epigenomics*, 11(2):133–145.
- Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S & Sorkin A, 2006. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Molecular Cell*, 21(6):737–748.
- Husni RE, Shiba-Ishii A, Nakagawa T, *et al.*, 2019. DNA hypomethylation-related overexpression of SFN, GORASP2 and ZYG11A is a novel prognostic biomarker for early stage lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 10(17):1625–1636.
- Ira G, Pellicoli A, Balijja A, *et al.*, 2004. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*, 431(7011):1011–1017.
- Jaenisch R & Bird A, 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33 Suppl:245–254.
- Janisch KM, Vock VM, Fleming MS, *et al.*, 2013. The vertebrate-specific Kinesin-6, Kif20b, is required for normal cytokinesis of polarized cortical stem cells and cerebral cortex size. *Development*, 140(23):4672–4682.
- Jiang R, Bush JO & Lidral AC, 2006. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Developmental Dynamics*, 235(5):1152–1166.
- Jugessur A, Farlie PG & Kilpatrick N, 2009. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Diseases*, 15(7):437–453.
- Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, *et al.*, 2011. Fetal genetic risk of isolated cleft lip only versus isolated cleft lip and palate: a subphenotype analysis using two population-based studies of orofacial clefts in Scandinavia. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 91(2):85–92.
- Kelly D, O'Dowd T & Reulbach U, 2012. Use of folic acid supplements and risk of cleft lip and palate in infants: a population-based cohort study. *The British Journal of General Practice*, 62(600):e466-72.
- Kim B-R, Kwon Y & Rho SB, 2017. BMI-1 interacts with sMEK1 and inactivates sMEK1-induced apoptotic cell death. *Oncology Reports*, 37(1):579–586.
- Kobayashi GS, Alvizi L, Sunaga DY, *et al.*, 2013. Susceptibility to DNA damage as a molecular mechanism for non-syndromic cleft lip and palate. *Plos One*, 8(6):e65677.
- Komander D, 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 5):937–953.

Komiya Y & Habas R, 2008. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2):68–75.

Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, *et al.*, 2002. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nature Genetics*, 32(2):285–289.

Kruglyak L, 2008. The road to genome-wide association studies. *Nature Reviews. Genetics*, 9(4):314–318.

Le Pabic P, Ng C & Schilling TF, 2014. Fat-Dachsous signaling coordinates cartilage differentiation and polarity during craniofacial development. *PLoS Genetics*, 10(10):e1004726.

Leslie EJ, Carlson JC, Shaffer JR, *et al.*, 2016. A multi-ethnic genome-wide association study identifies novel loci for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate on 2p24.2, 17q23 and 19q13. *Human Molecular Genetics*, 25(13):2862–2872.

Leslie EJ, Mansilla MA, Biggs LC, *et al.*, 2012. Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome-wide association on chromosome 1p22. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 94(11):934–942.

Leslie EJ & Marazita ML, 2013. Genetics of cleft lip and cleft palate. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 163C(4):246–258.

Loffredo LC, Souza JM, Freitas JA & Mossey PA, 2001. Oral clefts and vitamin supplementation. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 38(1):76–83.

Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, *et al.*, 2001. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene*, 20(12):1525–1528.

Machado RA, Nogueira EN, Martelli-Júnior H, *et al.*, 2018. 2p24.2 (rs7552) is a susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Clinical Genetics*, 93(6):1199–1204.

Malumbres M, 2014. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6):122.

Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, *et al.*, 2009. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461(7265):747–753.

Marazita ML, 2012. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 13:263–283.

Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, *et al.*, 2004. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *American Journal of Human Genetics*, 75(2):161–173.

Masotti C, Brito LA, Nica AC, *et al.*, 2018. MRPL53, a New Candidate Gene for Orofacial Clefting, Identified Using an eQTL Approach. *Journal of Dental Research*, 97(1):33–40.

Masser DR, Berg AS & Freeman WM, 2013. Focused, high accuracy 5-methylcytosine quantitation with base resolution by benchtop next-generation sequencing. *Epigenetics & Chromatin*, 6(1):33.

Menegotto BG & Salzano FM, 1991. Epidemiology of oral clefts in a large South American sample. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 28(4):373–6; discussion 376.

Menezes R, Letra A, Kim AH, *et al.*, 2010. Studies with Wnt genes and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 88(11):995–1000.

Mitchell LE, 2002. Mode of Inheritance of Oral Clefts. In DF Wyszynski (ed.), *Cleft lip and palate: From origin to treatment*. . Oxford: Oxford University Press, p. 234–239.

Mochizuki K, Hariya N & Kubota T, 2018. Novel models of epigenetic gene regulation in the nutritional environment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1012:11–18.

Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ & Shaw WC, 2009. Cleft lip and palate. *The Lancet*, 374(9703):1773–1785.

Murray JC, Daack-Hirsch S, Buetow KH, *et al.*, 1997. Clinical and epidemiologic studies of cleft lip and palate in the Philippines. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 34(1):7–10.

Naslavsky MS, Yamamoto GL, De Almeida TF, *et al.*, 2017. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Human Mutation*, 38(7):751–763.

Papakonstantinou N, Ntoufa S, Tsagiopoulou M, *et al.*, 2019. Integrated epigenomic and transcriptomic analysis reveals TP63 as a novel player in clinically aggressive chronic lymphocytic leukemia. *International Journal of Cancer*, 144(11):2695–2706.

Paranaíba, LM, Martelli-Júnior H, Oliveira Swerts MS, *et al.*, 2008. Novel mutations in the IRF6 gene in Brazilian families with Van der Woude syndrome. *International Journal of Molecular Medicine*, 22 (4):507–511.

Patterson K, Molloy L, Qu W & Clark S, 2011. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Journal of Visualized Experiments*, (56).

Peinado H, Olmeda D & Cano A, 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews. Cancer*, 7(6):415–428.

Phang H-Q, Hoon J-L, Lai S-K, *et al.*, 2014. POPX2 phosphatase regulates the KIF3 kinesin motor complex. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 4):727–739.

Pritchard JK & Cox NJ, 2002. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Human Molecular Genetics*, 11(20):2417–2423.

Reich DE & Lander ES, 2001. On the allelic spectrum of human disease. *Trends in Genetics*, 17(9):502–510.

- Rodrigues K, Sena MF De, Roncalli AG & Ferreira MAF, 2009. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Brazilian oral research*, 23(1):38–42.
- Ross DA & Kadesch T, 2004. Consequences of Notch-mediated induction of Jagged1. *Experimental Cell Research*, 296(2):173–182.
- Rotondo JC, Borghi A, Selvatici R, *et al.*, 2016. Hypermethylation-Induced Inactivation of the IRF6 Gene as a Possible Early Event in Progression of Vulvar Squamous Cell Carcinoma Associated With Lichen Sclerosus. *JAMA dermatology*, 152(8):928–933.
- Savastano CP, Brito LA, Faria AC, *et al.*, 2017. Impact of rare variants in ARHGAP29 to the etiology of oral clefts: role of loss-of-function vs missense variants. *Clinical Genetics*, 91(5):683–689.
- Schork NJ, Murray SS, Frazer KA & Topol EJ, 2009. Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(3):212–219.
- Schutte BC & Murray JC, 1999. The many faces and factors of orofacial clefts. *Human Molecular Genetics*, 8(10):1853–1859.
- Sebbagh M & Borg J-P, 2014. Insight into planar cell polarity. *Experimental Cell Research*, 328(2):284–295.
- Sharp GC, Ho K, Davies A, *et al.*, 2017. Distinct DNA methylation profiles in subtypes of orofacial cleft. *Clinical epigenetics*, 9:63.
- Shen Z, Zhu L, Zhang C, Cui X & Lu J, 2019. Overexpression of BHLHE41, correlated with DNA hypomethylation in 3'UTR region, promotes the growth of human clear cell renal cell carcinoma. *Oncology Reports*, 41(4):2137–2147.
- Skvortsova K, Stirzaker C & Taberlay P, 2019. The DNA methylation landscape in cancer. *Essays in biochemistry*,
- Sripathomsawat W, Tanpaiboon P, Heering J, *et al.*, 2011. Phenotypic analysis of Arg227 mutations of TP63 with emphasis on dental phenotype and micturition difficulties in EEC syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 155A(1):228–232.
- Stanier P & Moore GE, 2004. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human Molecular Genetics*, 13 Spec No 1:R73–81.
- Stuppia L, Capogreco M, Marzo G, *et al.*, 2011. Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 22(5):1722–1726.
- Su X, Chakravarti D & Flores ER, 2013. p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 13(2):136–143.
- Taib BG, Taib AG, Swift AC & Van Eeden S, 2015. Cleft lip and palate: diagnosis and management. *British Journal of Hospital Medicine*, 76(10):584–5, 588.

Tammen SA, Friso S & Choi S-W, 2013. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Molecular aspects of medicine*, 34(4):753–764.

Tanuma N, Nomura M, Ikeda M, *et al.*, 2009. Protein phosphatase Dusp26 associates with KIF3 motor and promotes N-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Oncogene*, 28(5):752–761.

Tarfiei G, Noruzinia M, Soleimani M, *et al.*, 2011. ROR2 promoter methylation change in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell journal*, 13(1):11–15.

Tetreault M, Bareke E, Nadaf J, Alirezaie N & Majewski J, 2015. Whole-exome sequencing as a diagnostic tool: current challenges and future opportunities. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 15(6):749–760.

Thomason HA, Zhou H, Kouwenhoven EN, *et al.*, 2010. Cooperation between the transcription factors p63 and IRF6 is essential to prevent cleft palate in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(5):1561–1569.

Topczewski J, Dale RM & Sisson BE, 2011. Planar cell polarity signaling in craniofacial development. *Organogenesis*, 7(4):255–259.

Twigg SRF & Wilkie AOM, 2015. New insights into craniofacial malformations. *Human Molecular Genetics*, 24(R1):R50-9.

Van Bokhoven H, Hamel BC, Bamshad M, *et al.*, 2001. p63 Gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *American Journal of Human Genetics*, 69(3):481–492.

Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, *et al.*, 2003. Preimplantation diagnosis for sonic hedgehog mutation causing familial holoprosencephaly. *The New England Journal of Medicine*, 348(15):1449–1454.

Wang H, Hetmanski JB, Ruczinski I, *et al.*, 2012. ROR2 gene is associated with risk of non-syndromic cleft palate in an Asian population. *Chinese Medical Journal*, 125(3):476–480.

Weller PA, Ogryzko EP, Corben EB, *et al.*, 1990. Complete sequence of human vinculin and assignment of the gene to chromosome 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(15):5667–5671.

Westendorf JJ, Kahler RA & Schroeder TM, 2004. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene*, 341:19–39.

Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, *et al.*, 2007. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 334(7591):464.

Xu D-P, Qu W-D, Sun C, *et al.*, 2018. A Study on Environmental Factors for Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 29(2):364–367.

Yalcin-Ozuysal O, Fiche M, Guitierrez M, *et al.*, 2010. Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates. *Cell Death and Differentiation*, 17(10):1600–1612.

Yoh K & Prywes R, 2015. Pathway Regulation of p63, a Director of Epithelial Cell Fate. *Frontiers in endocrinology*, 6:51.

Yu Y, Zuo X, He M, *et al.*, 2017. Genome-wide analyses of non-syndromic cleft lip with palate identify 14 novel loci and genetic heterogeneity. *Nature Communications*, 8:14364.

Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, *et al.*, 2004. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *The New England Journal of Medicine*, 351(8):769–780.