Gerson Shigeru Kobayashi

Análise do transcriptoma de células-tronco mesenquimais para o estudo da etiologia das fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas

Transcriptome analysis of mesenchymal stem cells to investigate the aetiology of non-syndromic cleft lip and palate

Instituto de Biociências
Universidade de São Paulo
São Paulo
2011

Gerson Shigeru Kobayashi

Análise do transcriptoma de células-tronco mesenquimais para o estudo da etiologia das fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas

Transcriptome analysis of mesenchymal stem cells to investigate the aetiology of non-syndromic cleft lip and palate

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.

Orientadora: Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Kobayashi, Gerson

Análise do transcriptoma de células-tronco mesenquimais para o estudo da etiologia das fissuras lábio-palatinas não-sindrômicas
93 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Fissura lábio-palatina 2. Expressão gênica 3. células-tronco mesenquimais. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno

Orientador

“ Never be bullied into silence.
Never allow yourself to be made a victim.
Accept no one's definition of your life;
define yourself. ”

—Harvey Fierstein

AGRADECIMENTOS

À Rita, que além de ser uma orientadora e pesquisadora excepcional, sempre cuidou de todos nós. Seu empenho em relação aos alunos vai muito além da ciência. Obrigado pela inspiração, pelo carinho, e pelo aprendizado.

À Dani Bueno, que me iniciou no estudo das fissuras e na cultura de células. Obrigado pela amizade, e pelo companheirismo tanto nos momentos de stress e fadiga, como também nos momentos de diversão.

A todos os colegas de laboratório, pelos bons momentos, pelas cervejas, pelo auxílio e incentivo. À Erika Yeh e à Meire, pelos ensinamentos e ajuda nos momentos difíceis. Aprendi muito com vocês! À Dani Yumi, por toda a ajuda com a bioinformática, pelas conversas, discussões, e risadas. Ao Lucas, novo companheiro de projeto, cuja paixão pela ciência é contagiante. Ao Luciano, pelo sincero coleguismo. Ao Bruno, Felipe, Simone e Larissa, pelo auxílio com as culturas celulares, citometria, e arrays. À Karina, pelas longas discussões e reflexões. À minha amiga May, pela companhia e diversão. Ao pessoal do Genoma e da sala 211, e à Nati, pela paciência e ajuda. Agradeço também à Constância e a todos os funcionários da Genética e do Genoma. Obrigado por tudo.

Agradeço aos velhos e novos amigos: Andrews, Rafa, Elaine, Alexandre, Fábio, Leo, Mel, Emiliano, Maneco, Carol, Eduardo, Renata, Cris, Mari, Sofia, e muitos outros, cuja amizade foi e sempre será incondicional. Em especial, agradeço à Camila, pela grande amizade e apoio. Sem vocês por perto não sei se estaria aqui hoje, e estou certo de que sempre poderei contar com vocês.

Aos meus pais, sem os quais não teria a oportunidade de me dedicar aos estudos. Seu apoio foi crucial para minha formação.

Agradeço também a todos os pacientes e doadores de dentes, sem os quais não haveria motivo ou meios para a realização do trabalho.

E finalmente, agradeço à FAPESP/CEPID, PROAP, CNPq e MCT, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

Notas I
Resumo II
Abstract III

Capítulo I. 01
Introdução Geral

Capítulo II. 13
Metodologia Geral

Capítulo III. 17
Human stem cell cultures from cleft lip/palate patients show enrichment of transcripts involved in extracelular matrix modeling by comparison to controls

Capítulo IV. 35
Gene expression analysis of cleft lip/palate stem cells reveals dysregulation of DNA damage repair and cell cycle checkpoint control pathways

Capítulo V. 71
Discussão Geral e Conclusões

Referências Bibliográficas 76

NOTAS

Esta dissertação de Mestrado compreende um trabalho inédito desenvolvido durante os anos de 2008 a 2011 no Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH/IB-USP).

A apresentação do trabalho seguiu o modelo de divisão em capítulos/artigos, modelo este aceito atualmente pelos programas de pós-graduação do Instituto de Biociências. Dessa maneira, são apresentados apenas os estudos que resultaram em um artigo científico publicado em 2010, e outro que será submetido em breve. Por esse motivo, optei por redigí-lo em inglês. As seções referentes à introdução, metodologia e discussão geral estão escritas em português, conforme especificado pelas regras deste Instituto.

Embora o novo acordo ortográfico da língua portuguesa esteja em vigência desde Janeiro de 2009, ficou estabelecido um período de transição até 2012, durante o qual são válidas tanto a regra nova quanto a antiga. Sendo assim, optei por utilizar as normas antigas, mantendo o uso de crases, das regras de acentuação anteriores e uso de trema.

As referências bibliográficas referentes a cada um dos artigos estão relacionadas ao final dos mesmos. Já as referências bibliográficas que constam na introdução, metodologia e discussão encontram-se ao final da tese. A norma bibliográfica escolhida foi a estipulada pela ABNT, exceto para o artigo já publicado.

Visto que cada artigo científico possui descrição de suas metodologias, o capítulo que se refere à metodologia geral se aterá apenas a uma breve explicação acerca de procedimentos não detalhados nos artigos.

RESUMO

A fissura lábio-palatina não-sindrômica (FLP NS) é uma doença multifatorial, determinada pela interação entre fatores genéticos e ambientais e sua incidência é estimada entre 0,34 e 2,29 a cada 1000 nascimentos. Trata-se de uma embriopatia causada por erros durante a morfogênese orofacial, a qual depende de uma fina regulação de mecanismos como proliferação celular, remodelagem de matriz extracelular, e transição epitélio-mesenquimal. Apesar de intensos esforços para se determinar fatores genéticos e ambientais de susceptibilidade, a etiologia desta malformação permanece pouco compreendida. Vários *loci* associados às FLP NS vêm sendo identificados por meio de estudos de mapeamento gênico convencionais, entretanto, a grande maioria dos resultados não se replica em diferentes estudos, e não há clareza acerca do efeito funcional das variantes detectadas. Neste contexto, uma abordagem interessante para investigar a etiologia da doença é a análise de expressão gênica, que pode ser utilizada para identificar alterações de vias biológicas que convergem na manifestação do quadro clínico. Em vista disso, neste trabalho nós utilizamos a análise do transcriptoma de células-tronco de polpa dental de pacientes portadores de FLP NS, com o intuito de identificar padrões de expressão relacionados a mecanismos biológicos relevantes para a embriopatogênese da doença. Obtivemos padrões de expressão que sugerem desregulação de mecanismos associados à remodelagem de matriz extracelular e à transição epitélio-mesenquimal. Além disso, ao utilizarmos diferentes condições de cultura celular, verificamos em uma nova amostra de pacientes a desregulação de vias biológicas relacionadas ao reparo de DNA e *checkpoint* do ciclo celular. Nossos dados revelam a aplicabilidade das células-tronco de polpa dental para este tipo de abordagem, e indicam que tais perfis de expressão podem levar ao acometimento da morfogênese lábio-palatina. Além disso, mostramos pela primeira vez uma conexão entre desregulação de expressão gênica e a documentada maior incidência de formas esporádicas de câncer em famílias segregando a FLP NS. Nossos resultados abrem novas possibilidades para a investigação da etiologia das FLP NS, e ajudarão na compreensão dos eventos embrionários que predispõem a essa malformação.

ABSTRACT

Non-syndromic cleft lip and palate (NSCL/P) is a multifactorial disease determined by the interplay between genetic and environmental factors, with a variable incidence of 0.34-2.29:1000 births. This malformation arises from errors during lip and palate morphogenesis, which requires tight regulation of biological mechanisms such as cellular proliferation, extracellular matrix remodelling, and epithelial-mesenchymal transition. Albeit much effort has been put into determining the genetic and environmental factors underlying disease susceptibility, the aetiology of NSCL/P remains obscure. Many candidate *loci* have been identified through conventional gene mapping strategies, however, there is a general lack of reproducibility across studies, and there is no consensus with regard to the functional implications of the identified genetic variants. In this context, an alternative approach resides in assessing differential expression patterns to identify alterations in biological networks that could lead to phenotype manifestation. Here, we analysed the transcriptome of dental pulp stem cells from NSCL/P patients in order to pinpoint dysregulated pathways involved in the embryopathogenesis of the disease. We encountered expression patterns related to dysregulation of extracellular matrix remodelling and epithelial mesenchymal transition. Moreover, by subjecting a novel NSCL/P sample to differential cell culture conditions, we observed abnormal transcription of genes partaking in DNA repair and cell cycle checkpoint pathways. Our results show the applicability of dental pulp stem cells to this strategy and suggest that the observed expression patterns could lead to impairment of lip and palate morphogenesis. Moreover, we described for the first time a connection between abnormal gene expression in these individuals and the elevated occurrence of sporadic cancer types in NSCL/P families. Our results open new possibilities to investigate the aetiology of NSCL/P and provide further insight into the ontogenetic events underlying disease predisposition.

CAPÍTULO I - Introdução e objetivos

1. Considerações gerais

As fissuras lábio-palatinas (FLPs) representam um grupo de anomalias faciais extremamente importante, correspondendo a cerca de 25% de todas as malformações congênitas (Slavkin, 1992). Para as formas não-sindrômicas (FLP NS), a incidência mundial varia de 0,34 a 2,29 em 1000 nascimentos, dependendo de fatores como: localização geográfica, condição sócio-econômica e etnia (Gorlin *et al*., 2001; Mossey *et al*., 2009). No Brasil, as estimativas variam entre 0,28 e 1,54 em 1000 (Menegotto *et al*., 1991; Loffredo *et al*., 2001). Dada a alta incidência e ao fato de que seus portadores necessitam de um extenso tratamento por uma equipe multidisciplinar (médicos, dentistas, fonoaudiólogos, geneticistas, psicólogos, nutricionistas, entre outros) para sua reabilitação, as FLPs representam um problema de saúde pública relevante (Kasten *et al*., 2008).

2. Classificação e etiologia

As FLPs podem ser classificadas em sindrômicas e não-sindrômicas. Aproximadamente 30% dos casos de FLP são sindrômicos, ou seja, ocorrem associados a outras anomalias, sendo os restantes 70% não-sindrômicos, onde a FLP é a única malformação presente (Schutte & Murray, 1999).

As FLPs sindrômicas, relacionadas a pelo menos 350 síndromes, podem estar associadas a doenças mendelianas já descritas, ser decorrentes de anomalias cromossômicas, ou ainda terem sua origem na ação de teratógenos durante a embriogênese (Gorlin *et al.*, 2001). O estudo das formas sindrômicas de FLP tem permitido a identificação de alguns genes candidatos envolvidos em sua etiologia, como por exemplo, o gene *IRF6* (síndrome de van der Woude) (Kondo *et al.*, 2002), o gene *PVRL1* (síndrome da displasia ectodérmica) (Suzuki *et al.*, 2000; Avila *et al.*, 2006), e o gene *TBX22* (fissura palatina e anquiloglossia ligada ao X) (Braybrook *et al.*, 2001; Marcano *et al.*, 2004). Além disso, foi evidenciado que muitos dos genes já identificados para as formas sindrômicas de FLP também podem contribuir para a etiologia das formas não-sindrômicas (Stanier & Moore, 2004).

Se por um lado muitos agentes etiológicos responsáveis por doenças mendelianas associadas às FLPs já foram identificados, por outro, o estudo dos fatores de predisposição às FLP NS é dificultado pela natureza dessa condição. A FLP NS é considerada uma doença de etiologia multifatorial, tendo influência de vários *loci*, com diferentes níveis de penetrância, e ainda associados a fatores ambientais (Murray, 1995). Em decorrência da alta complexidade desta patologia, há um esforço mundial na tentativa de identificar tanto os fatores genéticos como ambientais de predisposição às FLP NS. Visto que o entendimento da etiologia dessa forma de fissura ainda é relativamente pobre, e que esta apresenta uma alta incidência, no presente trabalho estudamos a variante não-sindrômica de FLP.

Há várias evidências de que fissuras de lábio acompanhadas ou não de fissura de palato possuem etiologia distinta quando comparadas às fissuras palatinas isoladas. Dados epidemiológicos mostram que FLP NS e fissuras de palato isoladas não segregam em uma mesma família (Fraser, 1970). Entretanto, em alguns casos, há sobreposição de etiologias, a exemplo da síndrome de van der Woude, causada por mutações no gene *IRF6*, na qual ambas as formas de fissura podem se manifestar na mesma genealogia (Gorlin *et al*., 2001; Kondo *et ai*., 2002; Carinci *et al*., 2007).

2.1. Fatores ambientais

A contribuição de fatores ambientais para a etiologia das FLP NS vem sendo amplamente estudada. Como o ambiente é maleável, dados gerados por tais estudos representam uma oportunidade a curto prazo para a aplicação de medidas a fim de se prevenir a recorrência desta malformação (Dixon *et al*., 2011). Neste sentido, estudos já identificaram alguns fatores de risco agindo durante a gravidez, por exemplo: tabagismo, uso de ácido retinóico, consumo de álcool, uso de anticonvulsivantes, ocorrência de infecções, deficiência de vitaminas, entre outros (Wyszynski & Beaty, 1996; Shaw *et al*., 1996; Houdayer & Bahuau, 1998, Métneki *et al*., 2005; Krapels *et al*., 2006).

3. Aspectos clínicos

As FLP NS são tipicamente caracterizadas pela presença de fenda no lábio superior com ou sem acometimento do palato, e sem associação a

outras anomalias (Fig. 1). Essa alteração leva à separação incompleta entre as cavidades nasal e oral, provocando distúrbios de alimentação, respiração e comunicação (Kasten *et al*., 2008).

Há uma grande variabilidade clínica entre os casos de FLP NS, ocorrendo desde fenótipos bastante amenos, que incluem anomalias subclínicas no músculo *orbicularis oris*, onde há uma descontinuidade das fibras musculares (Klotz *et al*., 2010), até as fissuras completas e bilaterais, que envolvem além do lábio, os palatos primário e secundário (Gorlin *et al.*, 2001) (Fig. 1), e que representam os quadros clínicos mais graves (Johnston & Bronsky, 1995). Nesses casos, além das alterações musculares, nas regiões afetadas pela fissura há uma ruptura ou quebra de continuidade do osso alveolar, na maxila, e do osso palatino. Sendo assim, há comprometimento tanto do tecido ósseo, como do muscular (De Mey *et al*., 1989; Kerrigan *et al*., 2000; Wijayaweera *et al.*, 2000).

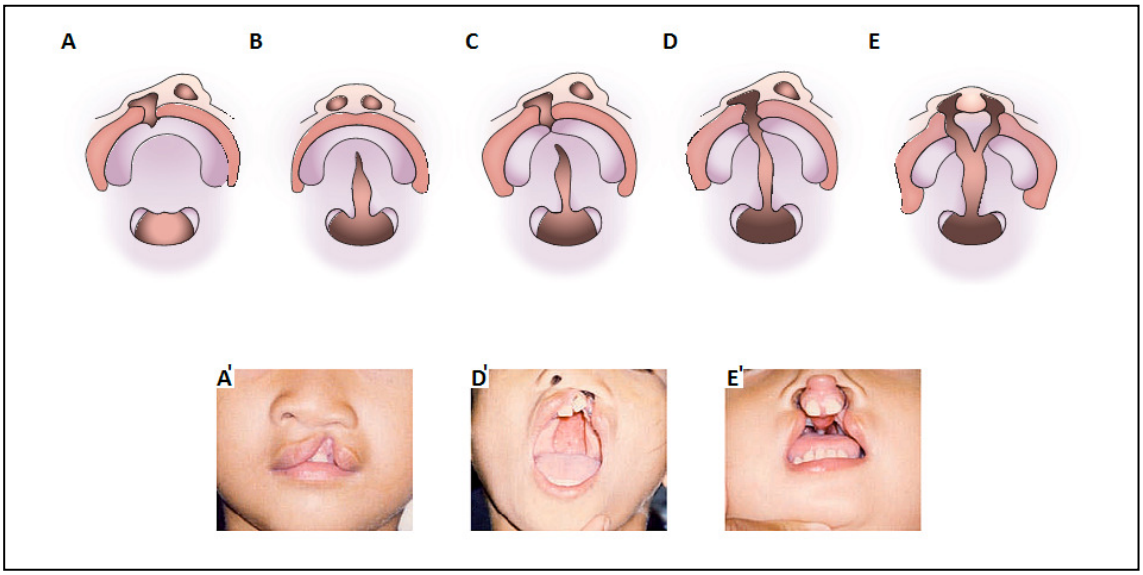

Figura 1: Variabilidade fenotípica das fissuras de lábio e palato. **A, A')** Fissura labial unilateral; **B)** Fissura palatina isolada; **C)** Fissura de lábio e palato unilateral incompleta; **D, D')** Fissura de lábio e palato unilateral completa; **E, E')** Fissura de lábio e palato bilateral completa. (Modificado de: Mossey *et al*., 2009; Dixon *et al*., 2011)

3. Desenvolvimento embrionário

A formação da face se inicia na 4ª semana de gestação, com a migração de células da crista neural craniana que, combinadas a células mesenquimais derivadas da mesoderme, formam os primórdios da face. Estes são constituídos por 5 proeminências, dispostas da seguinte maneira em relação ao estomodeu (precursor da cavidade oral): a) proeminência frontonasal, disposta rostralmente; b) 2 proeminências maxilares, dispostas lateralmente; c) 2 proeminências mandibulares, dispostas caudalmente. Entre a 5ª e 7ª semana da embriogênese, a mandíbula é formada a partir das proeminências maxilares, ao passo em que ocorre o crescimento da proeminência frontonasal, dando origem à proeminência nasal medial. Esta então cresce comcomitantemente às proeminências maxilares, ocorrendo a fusão e formando assim o lábio superior e o palato primário (Fig. 2A) (Jiang *et al*., 2006). A morfogênese do palato secundário se inicia na 6ª semana de vida intra-uterina, com o aparecimento de estruturas a partir das proeminências maxilares, chamadas de lâminas palatinas. Inicialmente, as lâminas palatinas crescem verticalmente, se posicionando em cada lado da língua em desenvolvimento. Então, ocorre a elevação e crescimento horizontal dessas estruturas, que entram em contato e subsequentemente se fundem acima do dorso da língua para formar o palato secundário, ao final da 12ª semana (Fig. 2B) (Kerrigan *et al*., 2000).

3.1 Mecanismos morfogenéticos

Levando-se em conta os dados da embriologia, acredita-se que as fissuras de lábio e palato são decorrentes de quaisquer fatores genéticos e ambientais que perturbem os mecanismos responsáveis pela correta orientação, crescimento, e fusão das proeminências faciais e das lâminas palatinas (Fig. 2C). A ontogenia orofacial se apoia no paradigma de que uma sinalização espaço-temporal precisa entre os tecidos embrionários é fundamental para a regulação de processos biológicos durante o desenvolvimento, dentre os quais podemos citar: o metabolismo de matriz extracelular, transição epitélio-mesenquimal, proliferação e migração celular, e apoptose (Jiang *et al*., 2006; Yu *et al*., 2009; Greene & Pisano, 2010).

Neste contexto, um dos mecanismos mais estudados é o de transição epitélio-mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition*, *EMT*). A *EMT* é um fenômeno biológico no qual células de fenótipo epitelial são reprogramadas, passando assim a manifestar um fenótipo tipicamente mesenquimal. Esta transformação é caracterizada por uma reprogramação celular que leva à perda de adesões intercelulares e aquisição de alta capacidade proliferativa, invasiva e migratória (Acloque *et al*., 2009). No contexto do desenvolvimento do lábio e palato, a *EMT* modula o processo de fusão das estruturas embrionárias orofaciais. Uma vez em contato, o epitélio dessas estruturas deve se desintegrar para que seja estabelecido um mesênquima contínuo. Sendo assim, as células epiteliais se transdiferenciam em células mesenquimais por *EMT* e atravessam a lâmina basal, invadindo o tecido mesenquimal (Sun *et al*., 2000; Nakazawa *et al*., 2008; Yu *et al*., 2009). É interessante ressaltar que existem evidências de que estas células epiteliais também sofrem apoptose, sendo que este mecanismo já foi considerado o principal responsável pela fusão do

lábio e do palato (Dudas *et al.*, 2007). No entanto, dados mais recentes indicam que tanto a morte celular programada como a *EMT* são processos envolvidos nesta etapa do desenvolvimento embrionário (Nakazawa *et al.*, 2008; Nawshad *et al.*, 2008; Iseki, 2011). Além da *EMT*, estudos relacionando capacidade de proliferação celular e metabolismo de matriz extracelular à etiologia das FLPs também vêm ganhando destaque (Sasaki *et al.*, 2004; Marinucci *et al.*, 2009; Dhulipala *et al.*, 2010; Enomoto *et al.*, 2010). Picos de proliferação celular, aliados a remodelagem de matriz extracelular, são necessários para o crescimento e posicionamento adequado das proeminências faciais e lâminas palatinas durante a morfogênese orofacial (Kerrigan *et al.*, 2000; Dhulipala *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009).

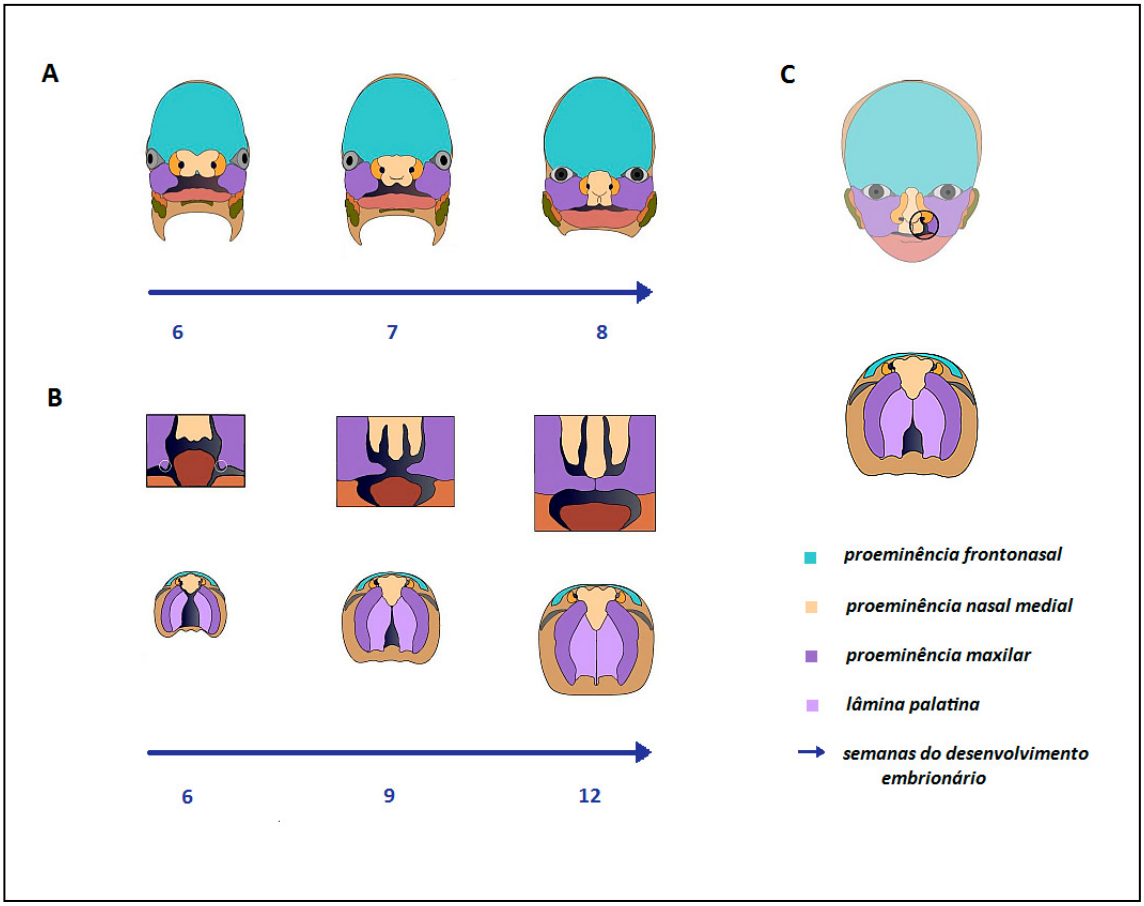

Figura 2: Morfogênese orofacial ao longo do desenvolvimento embrionário, e estruturas envolvidas. **A)** Morfogênese do lábio superior; **B)** Morfogênese do palato, em corte transversal (diagramas superiores), e em vista ventro-dorsal (diagramas inferiores); **C)** Fissura de lábio e palato. (Modificado de http://www.indiana.edu/~anat550/hnanim/face/face.html)

4. Estratégias para estudo de genes de predisposição às FLPs

4.1 Estudos de ligação e associação

Genes de susceptibilidade às FLP NS têm sido identificados em várias populações, inclusive na população brasileira (Gaspar *et al.*, 2002 & 2004; Dixon *et al.*, 2011). Para tanto, as abordagens de mapeamento genético mais utilizadas têm sido os estudos de ligação e associação.

Os estudos de ligação são baseadas na observação de co-segregação de marcadores genéticos conhecidos e o fenótipo da doença em uma ou mais famílias. Visto que *loci* próximos tendem a ser co-transmitidos por estarem geneticamente ligados, é possivel detectar regiões do genoma que potencialmente abrigam o agente etiológico da doença (Altshuler *et al.*, 2008). Este tipo de estudo requer um modelo de herança bem estabelecido, e são necessárias várias gerações com indivíduos afetados. Além disso, variantes genéticas de grande efeito são melhor detectadas com essa abordagem, a exemplo de doenças mendelianas. No entanto, segundo o modelo multifatorial de herança, as FLP NS são determinadas por vários alelos de pequeno efeito, sendo que a ocorrência de vários afetados em uma mesma família é rara.

Já nos estudos de associação de regiões candidatas e de varredura genômica (*genome-wide association study*), geralmente mais utilizados para doenças multifatoriais, é analisada a freqüência de polimorfismos entre casos e controles, estabelecendo-se assim uma associação estatística entre

presença de variante e manifestação de fenótipo. Porém, além de necessitarem de muitos indivíduos, esses estudos estão sujeitos a viés de estratificação populacional, distorcendo os resultados devido a freqüências alélicas mais freqüentes em uma determinada etnia; ou viés de desequilíbrio de ligação, no qual a variante detectada está mapeada próximo ao real agente etiológico (Altshuler *et al*., 2008).

Muitos *loci* de predisposição às FLP NS foram identificados seguindo as estratégias supracitadas (Dixon *et al*., 2011). Contudo, com exceção do gene *IRF6* e do *locus 8q24* (Ghassibé *et al.*, 2005; Park *et al*., 2007; Birnbaum *et al*., 2009; Beaty *et al*., 2010; Rojas-Martinez *et al*., 2010), não há consenso na literatura acerca da real relevância de cada um destes genes na etiologia das FLP NS, e sobretudo, de qual é o papel biológico dessas variantes na embriopatogênese da doença.

4.2 Análise do transcriptoma

Frente às dificuldades em se identificar *loci* de predisposição por meio do estudo de variantes no genoma de indivíduos acometidos por FLP NS, outra abordagem que pode ser empregada é a análise do perfil de expressão gênica. Esta estratégia permite a identificação de padrões de co-expressão gênica, associados a vias biológicas que, quando desreguladas, podem conferir predisposição à doença (Allocco *et al*., 2004; Cookson *et al*., 2009).

Tendo em vista a complexidade dos mecanismos embrionários que orquestram o desenvolvimento do lábio e palato, a análise de expressão

gênica é bastante promissora. Alguns estudos já utilizaram essa estratégia em modelos animais, onde foi analisado o perfil de expressão gênica global durante a embriogênese, levando à identificação de genes e vias de sinalização cruciais para o desenvolvimento orofacial adequado (Brown *et al*., 2003; Mukhopadhyay *et al*., 2004; Mukhopadhyay *et al*, 2010).

Além de elucidar melhor o papel de redes gênicas em situações normais de desenvolvimento, o estudo do transcriptoma pode ser aplicado à investigação das FLP e de outras doenças complexas. O perfil de expressão gênica nada mais é do que um reflexo do genoma e de suas variantes, observado sob a forma de padrões de expressão. Desta maneira, essa abordagem pode levar à confirmação de genes candidatos às FLP NS, caso suas variantes de risco estejam associadas a menores níveis de transcritos, e também à identificação de novos agentes etiológicos. Estes, por sua vez, podem estar diferencialmente expressos e exercer um efeito funcional, como no caso anterior, ou ainda, podem estar agindo como elementos regulatórios modulando o padrão de expressão ou co-regulação observado. Tendo em vista a suspeita de que perturbações em mecanismos de sinalização entre os tecidos embrionários possam ser os principais responsáveis pelas FLPs, consideramos essa estratégia adequada para investigar esta malformação.

Alguns grupos já relataram a existência de um perfil de expressão gênica associado às FLP NS. Jakobsen e colaboradores (2009), utilizando biópsias extraídas da região afetada pela fissura, encontraram um perfil de expressão distinto ao compararem indivíduos portadores de FLP NS e fissura palatina isolada. Do mesmo modo, foi observada uma desregulação de genes que

codificam moléculas de matriz extracelular, em culturas de fibroblastos de pacientes expostas a agentes teratogênicos (Bosi *et al*., 1998; Marinucci *et al*., 2009; Baroni *et al*., 2010). Esses dados confirmam a aplicabilidade de culturas celulares de pacientes para o estudo de expressão gênica e processos biológicos relevantes para a etiologia das FLP NS.

4.3 Uso de células-tronco mesenquimais (CTMs)

As células-tronco mesenquimais (CTMs) estão presentes em vários tecidos pós-natais e constituem populações celulares com capacidade de auto-renovação, se replicando por muitas gerações sem perder as características originais. *In vitro*, na presença de fatores de crescimento adequados, elas podem se diferenciar em osso, músculo, tecido adiposo, e cartilagem (Caplan, 2005). Já foi possível isolar células-tronco de diversos tecidos, como medula óssea, pele, tecido neural, retina, músculo esquelético e epitélio dentário (Gronthos *et al.*, 2002; Erices *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 1999; Miura *et al.*, 2003; Bueno *et al*., 2009).

Sabendo que as FLPs são decorrentes de perturbações durante a embriogênese, o uso de CTMs de polpa de dente decíduo para investigar a etiologia das fissuras pode ser bastante interessante e promissor. Além de serem obtidas de forma não-invasiva, a partir de dentes em fase de esfoliação, foi demonstrado que populações celulares extraídas de polpa de dente possuem origem em células derivadas da crista neural e células mesenquimais (Chai *et al*., 2000; Waddington *et al*., 2009), as quais compõem o mesênquima das proeminências faciais embrionárias. Além disso, visto que

há comprometimento de tecido ósseo e muscular na região da fissura, o potencial de diferenciação osteogênica e miogênica das CTMs de polpa de dente poderá ser de grande valia em estudos futuros.

5. Objetivos principais

Frente às dificuldades para se elucidar a etiologia das FLP NS por meio de estratégias convencionais de mapeamento genético, propomos neste trabalho a abordagem de estudo do transcriptoma de culturas celulares oriundas de indivíduos acometidos pela doença. Para tanto, os objetivos gerais são:

a) Verificar se as CTM extraídas de polpa de dente decíduo de indivíduos acometidos por FLP NS exibem uma assinatura de expressão específica;

b) Identificar genes desregulados e padrões de expressão relacionados ao perfil transcricional dessas células;

c) A partir dos padrões de expressão observados, identificar vias de sinalização e mecanismos biológicos candidatos à embriopatogênese da doença.

CAPÍTULO V - Discussão geral e conclusões

O presente trabalho consistiu na análise do perfil de expressão gênica de culturas de células-tronco mesenquimais (CTM) de polpa de dente decíduo, extraídas de pacientes acometidos por fissura lábio-palatina não-sindrômica (FLP NS). Demonstramos que estas culturas celulares apresentam uma assinatura de expressão gênica que é específica à doença. Além disso, identificamos padrões de desregulação transcricional que podem levar ao acometimento de processos biológicos relevantes para o desenvolvimento do lábio e palato.

No trabalho descrito no Capítulo III, identificamos desregulação de genes principalmente associados à remodelagem de matriz extracelular e transição epitélio-mesenquimal (*epithelial-mesenchymal* transition, *EMT*), dois processos biológicos extremamente importantes para a morfogênese orofacial. Para que haja o posicionamento correto das estruturas embrionárias que formarão o lábio e palato, é necessário um reprocessamento da matriz extracelular, permitindo a motilidade dessas estruturas. Tal atividade é caracterizada principalmente pela degradação de colágeno e outras moléculas de matriz pela ação de metaloproteinases (Kerrigan *et al*., 2000). Além disso, a *EMT*, que modula a fusão das proeminências faciais e lâminas palatinas, também depende desse mecanismo, uma vez que as células transdiferenciadas por *EMT* devem desintegrar a lâmina basal e invadir o tecido mesenquimal através do meio extracelular (Sun *et al*., 2000; Nakazawa *et al*., 2008; Yu *et al*., 2009). A observação de que, em CTMs de pacientes,

moléculas de matriz exibem níveis altos de expressão, enquanto que metaloproteinases exibem níveis menores, sugere que a desregulação desses componentes pode levar à manifestação de FLP durante a embriogênese.

Utilizando novas culturas de CTMs de pacientes e controles submetidas a uma condição de cultivo diferente (Capítulo IV), descrevemos um perfil de expressão distinto em relação ao obtido no Capítulo III. Observamos uma maior quantidade de genes diferencialmente expressos, e uma evidente desregulação de genes envolvidos nos mecanismo de reparo de DNA associado à proteína *BRCA1* e *checkpoint* do ciclo celular. Além disso, identificamos o fator de transcrição *E2F1* como elemento regulatório candidato à modulação do padrão de expressão observado. Esses resultados indicam que mecanismos relacionados principalmente à proliferação e progressão do ciclo celular também podem estar comprometidos em indivíduos portadores de FLP NS. A desregulação desses mecanismos pode estar relacionada à patogênese da doença, uma vez que um fino controle de proliferação celular é crucial para o crescimento das estruturas da face do embrião (Kerrigan *et al*., 2000; Dhulipala *et al*., 2006; Meng *et al*., 2009). Além disso, dados da literatura apontam que *E2F1* exerce um papel funcional durante a formação do palato (Kusek *et al*., 2000). A maior ocorrência de certos tipos de câncer em famílias segregando FLP NS também apoia a hipótese de desregulação de ciclo celular e reparo de DNA no contexto das fissuras, uma vez que detectamos transcrição anormal de muitos genes associados a formas hereditárias de câncer e em uma mesma via de interação, a exemplo do *BRCA1* (câncer de mama, ovário, e próstata), *MSH2* (câncer colorretal), *BLM* (síndrome de Bloom), entre outros. Esta é a primeira

evidência do envolvimento de uma rede gênica diretamente relacionada à tumorigênese com a etiologia das FLP NS.

Interessantemente, obtivemos 2 tipos distintos de padrões de expressão, a depender das condições de cultivo celular. Sabendo da natureza multifatorial das FLP NS, esses resultados nos levam a especular que a presença ou ausência de soro fetal bovino pode ser um modificador ambiental importante, levando à manifestação de perfis de expressão refletindo desregulação de diferentes mecanismos biológicos. Ainda, com a remoção de soro, obtivemos resultados semelhantes ao de outros grupos de pesquisa, que utilizaram agentes teratogênicos (como a fenitoína e a nicotina) em culturas de fibroblastos de pacientes com FLP NS. Nesses trabalhos, também foi averiguada uma expressão anormal de componentes de matriz extracelular, incluindo alguns colágenos (Bosi *et al*., 1998; Marinucci *et al*., 2009; Baroni *et al*., 2010); no entanto, nunca foi se estabeleceu uma relação entre os genes desregulados e a *EMT*. Sendo assim, é possível que a retirada de soro represente um insulto ambiental de efeito semelhante ao descrito por esses pesquisadores, porém, com o adicional comprometimento da *EMT* no tipo celular utilizado no presente trabalho. Finalmente, nossos resultados estão de acordo com a hipótese de que o genoma de indivíduos portadores de FLP NS abriga variantes ou mecanismos epigenéticos específicos que respondem diferentemente ao ambiente, em relação a controles. Por outro lado, estamos cientes de que para confirmar o efeito ambiental proporcionado pela retirada de soro, mais estudos serão necessários, sobretudo expondo as mesmas culturas celulares às diferentes condições de cultivo.

Em conjunto, nossos dados sugerem que culturas celulares de indivíduos portadores de FLP NS apresentam desregulação de redes gênicas relacionadas à remodelagem de matriz extracelular, transição epitélio-mesenquimal, e reparo de danos ao DNA e *checkpoint* do ciclo celular. Tais funções estão diretamente relacionadas a mecanismos fundamentais para a correta morfogênese do lábio e palato. Sendo assim, se anomalias nesses mecanismos são responsáveis pelo fenótipo de fissura, podemos inferir que padrões de expressão anômalos em tecidos embrionários podem ser transmitidos a tecidos adultos. No caso, sabe-se que populações celulares isoladas de polpa de dente são formadas por células originadas do tecido mesenquimal e células da crista neural do embrião (Chai *et al*., 2000; Waddington *et al*., 2009). Esta observação indica que as CTM de polpa de dente decíduo são de grande valia para estudar a etiologia das FLP NS, pois essas células possivelmente refletem erros de sinalização ocorridos em seus tecidos de origem.

Em resumo, dado o padrão de herança multifatorial das FLP NS, nossos resultados indicam que o reflexo transcricional gerado por diferentes variantes genéticas presentes no genoma ou epigenoma de portadores de FLP NS pode convergir na desregulação de mecanismos-chave para a patogênese desta malformação. Estudos futuros serão direcionados ao esclarecimento de vias regulatórias *upstream* aos padrões de expressão observados, bem como a uma investigação mais cautelosa acerca dos mecanismos aqui relatados. Testes funcionais serão necessários para confirmar o comprometimento das funções celulares identificadas nos experimentos de expressão gênica, particularmente em populações celulares sujeitas a insultos ambientais. Os

dados gerados por nossos estudos serão importantes para o entendimento acerca dos complexos mecanismos que orquestram a etiologia das FLP NS.

BIBLIOGRAFIA

1. ACLOQUE, H., ADAMS, M. S., FISHWICK, K., BRONNER-FRASER, M. & NIETO, M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. The Journal of clinical investigation, 119, 1438-49.

2. ALTSHULER, D., DALY, M. J., LANDER, E. S. 2008. Genetic mapping in human disease. Science, 322, 881-888.

3. AVILA, J. R., JEZEWSKI, P. A., VIEIRA, A. R., ORIOLI, I. M., CASTILLA, E. E., CHRISTENSEN, K., DAACK-HIRSCH, S., ROMITTI, P. A. & MURRAY, J. C. 2006. PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. American journal of medical genetics. Part A, 140, 2562-70.

4. BARONI, T., BELLUCCI, C., LILLI, C., PEZZETTI, F., CARINCI, F., LUMARE, E., PALMIERI, A., STABELLINI, G. & BODO, M. 2010. Human cleft lip and palate fibroblasts and normal nicotine-treated fibroblasts show altered in vitro expressions of genes related to molecular signaling pathways and extracellular matrix metabolism. Journal of cellular physiology, 222, 748-56.

5. BEATY, T. H., MURRAY, J. C., MARAZITA, M. L., MUNGER, R. G., RUCZINSKI, I., HETMANSKI, J. B., LIANG, K. Y., WU, T., MURRAY, T., FALLIN, M. D., REDETT, R. A., RAYMOND, G., SCHWENDER, H., JIN, S. C., COOPER, M. E., DUNNWALD, M., MANSILLA, M. A., LESLIE, E., BULLARD, S., LIDRAL, A. C., MORENO, L. M., MENEZES, R., VIEIRA, A. R., PETRIN, A., WILCOX, A. J., LIE, R. T., JABS, E. W., WU-CHOU, Y. H., CHEN, P. K., WANG, H., YE, X., HUANG, S., YEOW, V., CHONG, S. S., JEE, S. H., SHI, B., CHRISTENSEN, K., MELBYE, M., DOHENY, K. F., PUGH, E. W., LING, H., CASTILLA, E. E., CZEIZEL, A. E., MA, L., FIELD, L. L., BRODY, L., PANGILINAN, F., MILLS, J. L., MOLLOY, A. M., KIRKE, P. N., SCOTT, J. M., ARCOS-BURGOS, M. & SCOTT, A. F. 2010. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. Nature genetics, 42, 525-9.

6. BIRNBAUM, S., LUDWIG, K. U., REUTTER, H., HERMS, S., DE ASSIS, N. A., DIAZ-LACAVA, A., BARTH, S., LAUSTER, C., SCHMIDT, G., SCHEER, M., SAFFAR, M., MARTINI, M., REICH, R. H., SCHIEFKE, F., HEMPRICH, A., POTZSCH, S., POTZSCH, B., WIENKER, T. F., HOFFMANN, P., KNAPP, M., KRAMER, F. J., NOTHEN, M. M. & MANGOLD, E. 2009a. IRF6 gene variants in Central European patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. European journal of oral sciences, 117, 766-9.

7. BIRNBAUM, S., LUDWIG, K. U., REUTTER, H., HERMS, S., STEFFENS, M., RUBINI, M., BALUARDO, C., FERRIAN, M., ALMEIDA DE ASSIS, N., ALBLAS, M. A., BARTH, S., FREUDENBERG, J., LAUSTER, C., SCHMIDT, G., SCHEER, M., BRAUMANN, B., BERGE, S. J., REICH, R. H., SCHIEFKE, F., HEMPRICH, A., POTZSCH, S., STEEGERS-THEUNISSEN, R. P., POTZSCH, B., MOEBUS, S., HORSTHEMKE, B., KRAMER, F. J., WIENKER, T. F., MOSSEY, P. A., PROPPING, P., CICHON, S., HOFFMANN, P., KNAPP, M., NOTHEN, M. M. & MANGOLD, E. 2009b. Key susceptibility locus for

nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. Nature genetics, 41, 473-7.

8. BOSI, G., EVANGELISTI, R., VALENO, V., CARINCI, F., PEZZETTI, F., CALASTRINI, C., BODO, M. & CARINCI, P. 1998. Diphenylhydantoin affects glycosaminoglycans and collagen production by human fibroblasts from cleft palate patients. Journal of dental research, 77, 1613-21.

9. BRAYBROOK, C., DOUDNEY, K., MARCANO, A. C., ARNASON, A., BJORNSSON, A., PATTON, M. A., GOODFELLOW, P. J., MOORE, G. E. & STANIER, P. 2001. The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. Nature genetics, 29, 179-83.

10. BROWN, N. L., KNOTT, L., HALLIGAN, E., YARRAM, S. J., MANSELL, J. P. & SANDY, J. R. 2003. Microarray analysis of murine palatogenesis: temporal expression of genes during normal palate development. Development, growth & differentiation, 45, 153-65.

11. BUENO, D. F., KERKIS, I., COSTA, A. M., MARTINS, M. T., KOBAYASHI, G. S., ZUCCONI, E., FANGANIELLO, R. D., SALLES, F. T., ALMEIDA, A. B., DO AMARAL, C. E., ALONSO, N. & PASSOS-BUENO, M. R. 2009. New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients. Tissue engineering. Part A, 15, 427-35.

12. CAPLAN, A. I. 2005. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. Tissue engineering, 11, 1198-211.

13. CARINCI, F., SCAPOLI, L., PALMIERI, A., ZOLLINO, I. & PEZZETTI, F. 2007. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. International journal of pediatric otorhinolaryngology, 71, 1509-19.

14. CHAI, Y., JIANG, X., ITO, Y., BRINGAS, P., JR., HAN, J., ROWITCH, D. H., SORIANO, P., MCMAHON, A. P. & SUCOV, H. M. 2000. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. Development, 127, 1671-9.

15. CHRISTENSEN, K. & MORTENSEN, P. B. 2002. Facial clefting and psychiatric diseases: a follow-up of the Danish 1936-1987 Facial Cleft cohort. The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association, 39, 392-6.

16. COBOURNE, M. T. 2004. The complex genetics of cleft lip and palate. European journal of orthodontics, 26, 7-16.

17. COOKSON, W., LIANG, L., ABECASIS, G., MOFFATT, M. & LATHROP, M. 2009. Mapping complex disease traits with global gene expression. Nature reviews. Genetics, 10, 184-94.

18. DE MEY, A., VAN HOOF, I., DE ROY, G. & LEJOUR, M. 1989. Anatomy of the orbicularis oris muscle in cleft lip. British journal of plastic surgery, 42, 710-4.

19. DHULIPALA, V. C., WELSHONS, W. V. & REDDY, C. S. 2006. Cell cycle proteins in normal and chemically induced abnormal secondary palate development: a review. Human & experimental toxicology, 25, 675-82.

20. DHULIPALA, V. C., MADDALI, K. K., RAY, B. K., WELSHONS, W. V. & REDDY, C. S. 2010. Role of p21 and cyclin E in normal and secalonic acid D-inhibited proliferation of human embryonic palatal mesenchymal cells. Human & experimental toxicology.

21. DIXON, M. J., MARAZITA, M. L., BEATY, T. H. & MURRAY, J. C. 2011. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. Nature reviews. Genetics, 12, 167-78.

22. DUDAS, M., LI, W. Y., KIM, J., YANG, A. & KAARTINEN, V. 2007. Palatal fusion - where do the midline cells go? A review on cleft palate, a major human birth defect. Acta histochemica, 109, 1-14.

23. ENOMOTO, H., NELSON, C. M., SOMERVILLE, R. P., MIELKE, K., DIXON, L. J., POWELL, K. & APTE, S. S. 2010. Cooperation of two ADAMTS metalloproteases in closure of the mouse palate identifies a requirement for versican proteolysis in regulating palatal mesenchyme proliferation. Development, 137, 4029-38.

24. ERICES, A., CONGET, P. & MINGUELL, J. J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. British journal of haematology, 109, 235-42.

25. FRASER, F. C. 1970. The genetics of cleft lip and cleft palate. American journal of human genetics, 22, 336-52.

26. GASPAR, D. A., MATIOLI, S. R., DE CASSIA PAVANELLO, R., ARAUJO, B. C., ALONSO, N., WYSZYNSKI, D. & PASSOS-BUENO, M. R. 2004. Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. European journal of human genetics : EJHG, 12, 521-6.

27. GASPAR, D. A., MATIOLI, S. R., PAVANELLO, R. C., ARAUJO, B. C., ANDRE, M., STEMAN, S., OTTO, P. A. & PASSOS-BUENO, M. R. 2002. Evidence that BCL3 plays a role in the etiology of nonsyndromic oral clefts in Brazilian families. Genetic epidemiology, 23, 364-74.

28. GHASSIBE, M., BAYET, B., REVENCU, N., VERELLEN-DUMOULIN, C., GILLEROT, Y., VANWIJCK, R. & VIKKULA, M. 2005. Interferon regulatory factor-6: a gene predisposing to isolated cleft lip with or without cleft palate in the Belgian population. European journal of human genetics : EJHG, 13, 1239-42.

29. GORLIN, R. J., COHEN, M. M. & HENNEKAM, R. C. M. 2001. Syndromes of the head and neck, Oxford England ; New York, Oxford University Press.

30. GREENE, R. M. & PISANO, M. M. 2010. Palate morphogenesis: Current understanding and future directions. Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews, 90, 133-54.

31. GRONTHOS, S., BRAHIM, J., LI, W., FISHER, L. W., CHERMAN, N., BOYDE, A., DENBESTEN, P., ROBEY, P. G. & SHI, S. 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. Journal of dental research, 81, 531-5.

32. HOUDAYER, C. & BAHUAU, M. 1998. Orofacial cleft defects: inference from nature and nurture. Annales de genetique, 41, 89-117.

33. ISEKI, S. 2011. Disintegration of the medial epithelial seam: is cell death important in palatogenesis? Development, growth & differentiation, 53, 259-68.

34. JAKOBSEN, L. P., BORUP, R., VESTERGAARD, J., LARSEN, L. A., LAGE, K., MAROUN, L. L., KJAER, I., NIEMANN, C. U., ANDERSEN, M., KNUDSEN, M. A., MOLLGARD, K. & TOMMERUP, N. 2009. Expression analyses of human cleft palate tissue suggest a role for osteopontin and immune related factors in palatal development. Experimental & molecular medicine, 41, 77-85.

35. JIANG, R., BUSH, J. O. & LIDRAL, A. C. 2006. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, 235, 1152-66.

36. JOHNSTON, M. C. & BRONSKY, P. T. 1995. Prenatal craniofacial development: new insights on normal and abnormal mechanisms. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists, 6, 25-79.

37. KASTEN, E. F., SCHMIDT, S. P., ZICKLER, C. F., BERNER, E., DAMIAN, L. A., CHRISTIAN, G. M., WORKMAN, H., FREEMAN, M., FARLEY, M. D. & HICKS, T. L. 2008. Team care of the patient with cleft lip and palate. Current problems in pediatric and adolescent health care, 38, 138-58.

38. KERRIGAN, J. J., MANSELL, J. P., SENGUPTA, A., BROWN, N. & SANDY, J. R. 2000. Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh, 45, 351-8.

39. KLOTZ, C. M., WANG, X., DESENSI, R. S., GRUBS, R. E., COSTELLO, B. J. & MARAZITA, M. L. 2010. Revisiting the recurrence risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. American journal of medical genetics. Part A, 152A, 2697-702.

40. KONDO, S., SCHUTTE, B. C., RICHARDSON, R. J., BJORK, B. C., KNIGHT, A. S., WATANABE, Y., HOWARD, E., DE LIMA, R. L., DAACK-HIRSCH, S., SANDER, A., MCDONALD-MCGINN, D. M., ZACKAI, E. H., LAMMER, E. J., AYLSWORTH, A. S., ARDINGER, H. H., LIDRAL, A. C., POBER, B. R., MORENO, L., ARCOS-BURGOS, M., VALENCIA, C., HOUDAYER, C., BAHUAU, M., MORETTI-FERREIRA, D., RICHIERI-COSTA, A., DIXON, M. J. & MURRAY, J. C. 2002. Mutations in IRF6

cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. Nature genetics, 32, 285-9.

41. KRAPELS, I. P., VERMEIJ-KEERS, C., MULLER, M., DE KLEIN, A. & STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. 2006. Nutrition and genes in the development of orofacial clefting. Nutrition reviews, 64, 280-8.

42. LIDRAL, A. C., MORENO, L. M. & BULLARD, S. A. 2008. Genetic Factors and Orofacial Clefting. Seminars in orthodontics, 14, 103-114.

43. LOFFREDO, L. C. M., FREITAS, J. A. S., GRIGOLLI, A. A. G. 2001. Prevalence of oral clefts from 1975 to 1994, Brazil. Revista de Saúde Pública, 35.

44. MANGOLD, E., LUDWIG, K. U., BIRNBAUM, S., BALUARDO, C., FERRIAN, M., HERMS, S., REUTTER, H., DE ASSIS, N. A., CHAWA, T. A., MATTHEISEN, M., STEFFENS, M., BARTH, S., KLUCK, N., PAUL, A., BECKER, J., LAUSTER, C., SCHMIDT, G., BRAUMANN, B., SCHEER, M., REICH, R. H., HEMPRICH, A., POTZSCH, S., BLAUMEISER, B., MOEBUS, S., KRAWCZAK, M., SCHREIBER, S., MEITINGER, T., WICHMANN, H. E., STEEGERS-THEUNISSEN, R. P., KRAMER, F. J., CICHON, S., PROPPING, P., WIENKER, T. F., KNAPP, M., RUBINI, M., MOSSEY, P. A., HOFFMANN, P. & NOTHEN, M. M. 2010. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. Nature genetics, 42, 24-6.

45. MARCANO, A. C., DOUDNEY, K., BRAYBROOK, C., SQUIRES, R., PATTON, M. A., LEES, M. M., RICHIERI-COSTA, A., LIDRAL, A. C., MURRAY, J. C., MOORE, G. E. & STANIER, P. 2004. TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate. Journal of medical genetics, 41, 68-74.

46. MARINUCCI, L., BALLONI, S., BODO, M., CARINCI, F., PEZZETTI, F., STABELLINI, G., CONTE, C. & LUMARE, E. 2009. Patterns of some extracellular matrix gene expression are similar in cells from cleft lip-palate patients and in human palatal fibroblasts exposed to diazepam in culture. Toxicology, 257, 10-6.

47. MARINUCCI, L., BALLONI, S., CARINCI, F., LOCCI, P., PEZZETTI, F. & BODO, M. 2011. Diazepam effects on non-syndromic cleft lip with or without palate: epidemiological studies, clinical findings, genes and extracellular matrix. Expert opinion on drug safety, 10, 23-33.

48. MENEGOTTO, B. G. & SALZANO, F. M. 1991. Epidemiology of oral clefts in a large South American sample. The Cleft palate-craniofacial journal : official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association, 28, 373-6; discussion 376-7.

49. MENEZES, R., MARAZITA, M. L., GOLDSTEIN MCHENRY, T., COOPER, M. E., BARDI, K., BRANDON, C., LETRA, A., MARTIN, R. A. & VIEIRA, A. R. 2009. AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. Journal of the American Dental Association, 140, 80-4.

50. MENG, L., BIAN, Z., TORENSMA, R. & VON DEN HOFF, J. W. 2009. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. Journal of dental research, 88, 22-33.

51. METNEKI, J., PUHO, E. & CZEIZEL, A. E. 2005. Maternal diseases and isolated orofacial clefts in Hungary. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 73, 617-23.

52. MIURA, M., GRONTHOS, S., ZHAO, M., LU, B., FISHER, L. W., ROBEY, P. G. & SHI, S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 5807-12.

53. MOSSEY, P. A., LITTLE, J., MUNGER, R. G., DIXON, M. J. & SHAW, W. C. 2009. Cleft lip and palate. Lancet, 374, 1773-85.

54. MUKHOPADHYAY, P., BROCK, G., PIHUR, V., WEBB, C., PISANO, M. M. & GREENE, R. M. 2010. Developmental microRNA expression profiling of murine embryonic orofacial tissue. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 88, 511-34.

55. MUKHOPADHYAY, P., GREENE, R. M., ZACHARIAS, W., WEINRICH, M. C., SINGH, S., YOUNG, W. W., JR. & PISANO, M. M. 2004. Developmental gene expression profiling of mammalian, fetal orofacial tissue. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 70, 912-26.

56. MURAOKA, N., SHUM, L., FUKUMOTO, S., NOMURA, T., OHISHI, M. & NONAKA, K. 2005. Transforming growth factor-beta3 promotes mesenchymal cell proliferation and angiogenesis mediated by the enhancement of cyclin D1, Flk-1, and CD31 gene expression during CL/Fr mouse lip fusion. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 73, 956-65.

57. MURRAY, J. C. 1995. Face facts: genes, environment, and clefts. American journal of human genetics, 57, 227-32.

58. NAKAZAWA, M., MATSUNAGA, K., ASAMURA, S., KUSUHARA, H., ISOGAI, N. & MURAGAKI, Y. 2008. Molecular mechanisms of cleft lip formation in CL/Fr mice. Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery / Nordisk plastikkirurgisk forening [and] Nordisk klubb for handkirurgi, 42, 225-32.

59. NAWSHAD, A. 2008. Palatal seam disintegration: to die or not to die? that is no longer the question. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, 237, 2643-56.

60. PARK, J. W., MCINTOSH, I., HETMANSKI, J. B., JABS, E. W., VANDER KOLK, C. A., WU-CHOU, Y. H., CHEN, P. K., CHONG, S. S., YEOW, V., JEE, S. H., PARK, B. Y., FALLIN, M. D., INGERSOLL, R., SCOTT, A. F. & BEATY, T. H. 2007. Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 9, 219-27.

61. PEZZETTI, F., CARINCI, F., PALMIERI, A., VIZZOTTO, L., MOSCHENI, C., VERTEMATI, M., CALASTRINI, C., PELLATI, A. & STABELLINI, G. 2009. Diphenylhydantoin plays a role in gene expression related to cytoskeleton and protein adhesion in human normal palate fibroblasts. Pathology, 41, 261-8.

62. ROJAS-MARTINEZ, A., REUTTER, H., CHACON-CAMACHO, O., LEON-CACHON, R. B., MUNOZ-JIMENEZ, S. G., NOWAK, S., BECKER, J., HERBERZ, R., LUDWIG, K. U., PAREDES-ZENTENO, M., ARIZPE-CANTU, A., RAEDER, S., HERMS, S., ORTIZ-LOPEZ, R., KNAPP, M., HOFFMANN, P., NOTHEN, M. M. & MANGOLD, E. 2010. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population: Evidence for IRF6 and variants at 8q24 and 10q25. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 88, 535-7.

63. SASAKI, Y., TANAKA, S., HAMACHI, T. & TAYA, Y. 2004. Deficient cell proliferation in palatal shelf mesenchyme of CL/Fr mouse embryos. Journal of dental research, 83, 797-801.

64. SCHUTTE, B. C. & MURRAY, J. C. 1999. The many faces and factors of orofacial clefts. Human molecular genetics, 8, 1853-9.

65. SHAW, G. M., WASSERMAN, C. R., LAMMER, E. J., O'MALLEY, C. D., MURRAY, J. C., BASART, A. M. & TOLAROVA, M. M. 1996. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. American journal of human genetics, 58, 551-61.

66. SLAVKIN, H. C. 1992. Incidence of cleft lips, palates rising. Journal of the American Dental Association, 123, 61-5.

67. STANIER, P. & MOORE, G. E. 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.

68. SUN, D., BAUR, S. & HAY, E. D. 2000. Epithelial-mesenchymal transformation is the mechanism for fusion of the craniofacial primordia involved in morphogenesis of the chicken lip. Developmental biology, 228, 337-49.

69. SUZUKI, K., HU, D., BUSTOS, T., ZLOTOGORA, J., RICHIERI-COSTA, A., HELMS, J. A. & SPRITZ, R. A. 2000. Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. Nature genetics, 25, 427-30.

70. WADDINGTON, R. J., YOUDE, S. J., LEE, C. P. & SLOAN, A. J. 2009. Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. Cells, tissues, organs, 189, 268-74.

71. WIJAYAWEERA, C. J., AMARATUNGA, N. A. & ANGUNAWELA, P. 2000. Arrangement of the orbicularis oris muscle in different types of cleft lips. The Journal of craniofacial surgery, 11, 232-5.

72. WILLIAMS, J. T., SOUTHERLAND, S. S., SOUZA, J., CALCUTT, A. F. & CARTLEDGE, R. G. 1999. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. The American surgeon, 65, 22-6.

73. WYSZYNSKI, D. F. & BEATY, T. H. 1996. Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. Teratology, 53, 309-17.

74. YOUNG, D. L., SCHNEIDER, R. A., HU, D. & HELMS, J. A. 2000. Genetic and teratogenic approaches to craniofacial development. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists, 11, 304-17.

75. YU, W., RUEST, L. B. & SVOBODA, K. K. 2009. Regulation of epithelial-mesenchymal transition in palatal fusion. Experimental biology and medicine, 234, 483-91.

76. ZHANG, Y., MORI, T., ISEKI, K., HAGINO, S., TAKAKI, H., TAKEUCHI, M., HIKAKE, T., TASE, C., MURAKAWA, M., YOKOYA, S. & WANAKA, A. 2003. Differential expression of decorin and biglycan genes during palatogenesis in normal and retinoic acid-treated mice. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, 226, 618-26.

77. ZHU, H., KARTIKO, S. & FINNELL, R. H. 2009. Importance of gene-environment interactions in the etiology of selected birth defects. Clinical genetics, 75, 409-23.