

Carolina Malcher Amorim de Carvalho Silva

Investigação do papel de SNVs (*single nucleotide variants*) na etiologia da fissura lábio-palatina não sindrômica

*Investigation of the role of SNVs (single nucleotide variants) in the etiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate*

São Paulo

2013

Carolina Malcher Amorim de Carvalho Silva

Investigação do papel de SNVs (*single nucleotide variants*) na etiologia da fissura lábio-palatina não sindrômica

*Investigation of the role of SNVs (single nucleotide variants) in the etiology of nonsyndromic cleft lip with or without cleft 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.

Orientador(a): Maria Rita dos Santos e Passos Bueno

São Paulo

2013

## Resumo

---

Fissura de lábio com ou sem fissura de palato não-sindrômica (FL/P NS) é uma malformação craniofacial frequente, com modelo de herança multifatorial, onde fatores de risco genéticos e ambientais atuam na manifestação da doença. Variações nos níveis de expressão gênica têm sido apontadas como um importante mecanismo de susceptibilidade a doenças complexas, e variantes no DNA que regulam esses níveis de expressão (eQTL) têm sido combinadas a estudos de associação para auxiliar no entendimento da etiologia de algumas doenças. No presente trabalho, integramos eQTLs e estudo de associação para 1) verificar se variantes já associadas com FL/P NS possuem um papel regulatório em células-tronco de músculo orbicular do lábio (OOMMSC, um tecido afetado em FL/P NS), e 2) verificar se eQTLs mapeados em OOMMSC teriam associação com a mesma. Para o primeiro objetivo, verificamos a correlação entre os genótipos das variantes rs642961 e rs590223 e os níveis de expressão de *IRF6*, e também entre rs987525 e os níveis de expressão de *MYC*. Não encontramos correlação para nenhuma das três variantes testadas. É possível que essas variantes possuam um papel funcional em algum momento específico da embriogênese, ou mesmo que não tenhamos detectado essa correlação devido ao número amostral analisado (N=46). Para o segundo objetivo, realizamos um estudo de associação do tipo caso-controle dos eQTLs rs5011163, rs1505443, rs4793213, rs4793229 e rs1242500. Não encontramos associação entre nenhuma das cinco variantes e FL/P NS. Uma possível explicação para a associação negativa seria a significância marginal dessas variantes como eQTLs em OOMMSC. Além disso, estudos com baixo poder, como o mapeamento de eQTLs em OOMMSC realizado em outro projeto pelo nosso grupo, geralmente detectam os eQTLs de maior efeito, sendo esses frequentemente compartilhados entre tecidos, e, assim, podem não ter relevância para a doença em si. Outros eQTLs de OOMMSC, selecionados por critérios diferentes do presente estudo, estão sendo testados para associação com FL/P NS, o que nos permitirá avaliar a relevância dessa abordagem para detectar variantes de susceptibilidade a FL/P NS.

## *Abstract*

---

Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P) is a frequent craniofacial malformation, with a multifactorial model of inheritance, in which genetic and environmental risk factors act in disease manifestation. Variation of gene expression has been pointed as an important susceptibility mechanism to complex diseases, and DNA variants that regulate expression levels (eQTLs) have been combined with association studies to help elucidate the etiology of some diseases. In the present work, we integrate eQTL and association studies to 1) verify if variants associated with NSCL/P have a regulatory role in *orbicularis oris* muscle mesenchymal stem cells (OOMMSC, a tissue affected by NSCL/P); and 2) verify if eQTLs mapped in OOMMSC are associated with the disease. For the first goal, we verified the correlation of the rs642961 and rs590223 genotype variants with *IRF6* expression levels, and also between the rs987525 genotype and *MYC* expression levels. We did not find correlation for any of the three variants tested. Possibly, these variants have a functional role in specific moments of embryogenesis, or sample size (N=46) was insufficient to detect correlation. For the second goal, we did a case-control association study for eQTLs rs5011163, rs1505443, rs4793213, rs4793229 and rs1242500. We did not find association between these variants and NSCL/P. The negative association could be explained by the marginal significance of these variants as eQTLs in OOMMSC. Besides, low-power studies, as the OOMMSC eQTL mapping performed in another project by our group, usually detect eQTLs of larger effect, which are frequently shared among tissues; therefore, they may not be relevant for the disease itself. Other eQTLs, selected under different criteria, are currently being tested for association with NSCL/P, which will enable us to evaluate the relevance of this approach to detect susceptibility variants for NSCL/P.

# Capítulo 1. Introdução Geral e Objetivos

---

## 1.1. Fissura de lábio com ou sem fissura de palato

Fissuras de lábio associadas ou não a fissuras de palato (FL/P) estão entre as malformações congênitas mais comuns, e caracterizam-se essencialmente pela separação incompleta das cavidades oral e nasal, admitindo um grande espectro de variabilidade clínica. A fissura pode afetar desde apenas o lábio (FL), ou até o palato (FLP). O acometimento do lábio pode ser unilateral ou bilateral, enquanto o palato pode ser acometido apenas no palato mole, ou até o palato duro (Figura 1).

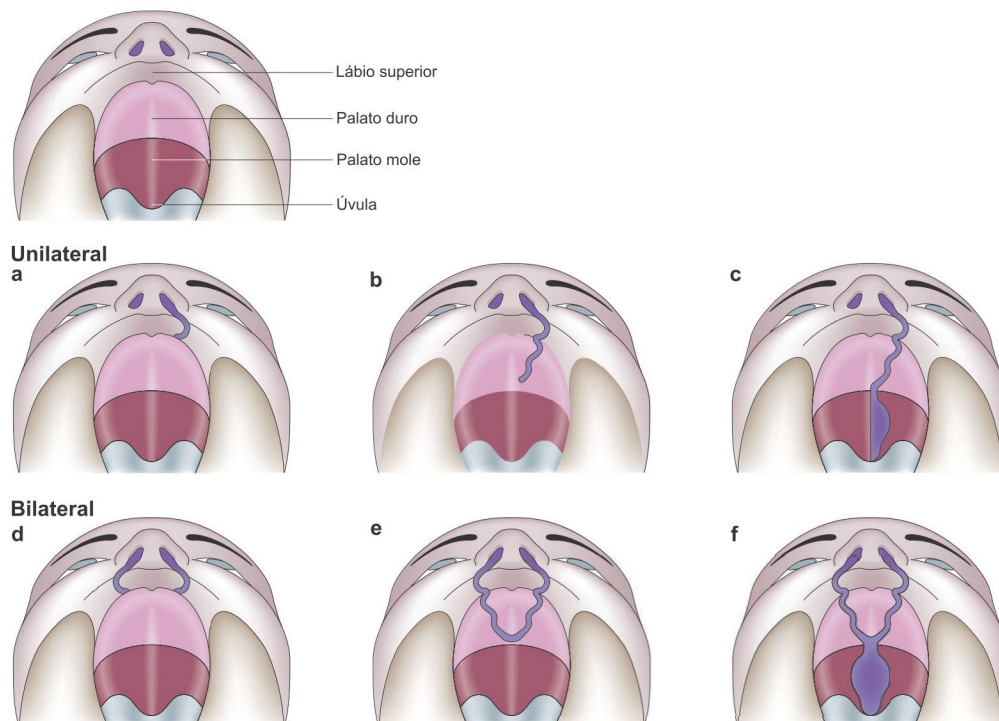


Figura 1: Desenho esquemático do lábio e palato, demonstrando as variações clínicas da FL/P, envolvendo desde apenas o lábio (a,d), afetando o palato duro (b,e), até o palato

mole (c, f); As figuras a, b, c mostram variações de fissura unilateral; As figuras d, e, f mostram variações de fissura bilateral (Mod. de DIXON *et al.*, 2011).

As fissuras lábio-palatinas também podem se apresentar como microformas mais brandas, de difícil percepção, como, por exemplo, uma simples cicatriz no lábio, uma descontinuidade do músculo orbicular do lábio (detectada através de ultrassonografia, WEINBERG *et al.*, 2008), fissura de palato submucosa (união imperfeita do músculo no véu palatino, mas com superfície da mucosa intacta; GORLIN *et al.*, 2001), e úvula bífida.

Como o lábio e o palato primário possuem origens embriológicas distintas do palato secundário, as FL/P são consideradas entidades etiologicamente distintas das fissuras palatinas (FP), nas quais o lábio não é afetado (MOSSEY *et al.*, 2009). Essa distinção é reforçada por dados epidemiológicos e pelo fato das duas formas geralmente não segregarem na mesma família (DIXON *et al.*, 2011).

### **1.1.2. Embriologia**

As fissuras lábio-palatinas resultam de uma falha na fusão dos processos maxilares e das lâminas palatinas, na formação do lábio e palato, o que ocorre entre a quarta e décima segunda semanas de gestação, conforme representado na Figura 2.

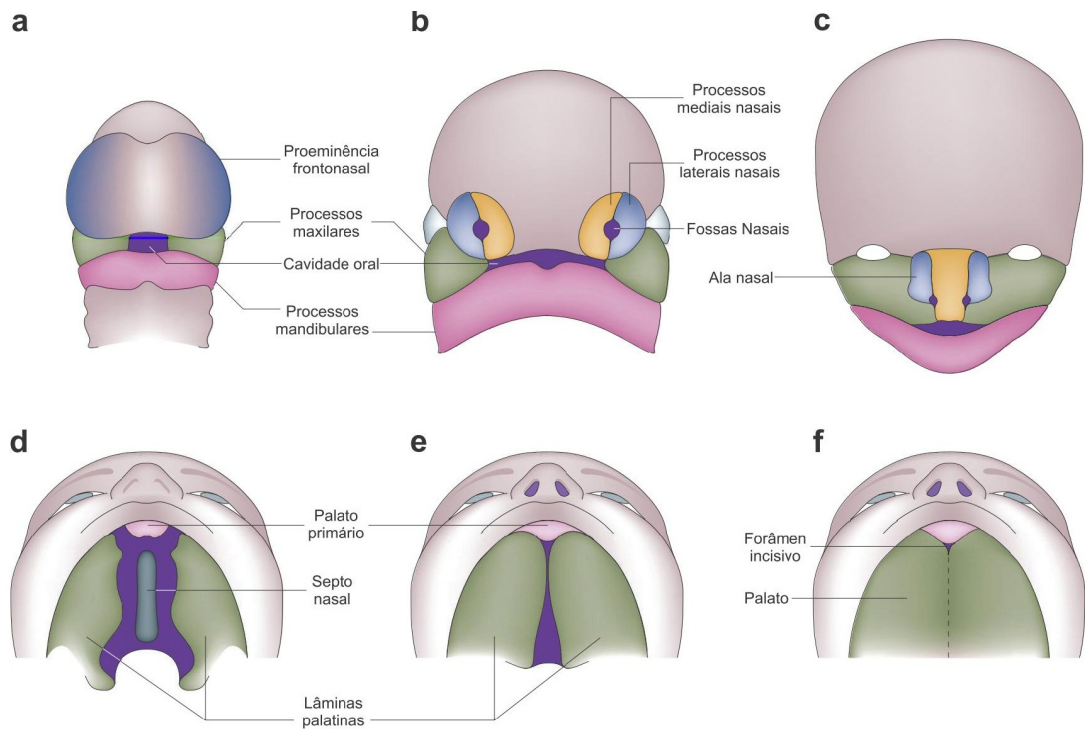


Figura 2: Desenho esquemático do desenvolvimento do lábio e palato em humanos. a) Ao redor da quarta semana de desenvolvimento embrionário ocorre o desenvolvimento da proeminência frontonasal (observada em azul), os processos maxilares (verde), os processos mandibulares pareados (rosa), e a cavidade oral primitiva ao centro (roxo); b) Ao redor da quinta semana, as fossas nasais são formadas (roxo), o que leva à formação dos processos nasais pareados mediais (amarelo) e laterais (azul); c) Ao fim da sexta semana os processos mediais nasais se fundem com os processos maxilares para a formação do lábio superior e palato primário. Os processos laterais nasais formam a ala nasal (amarelo). De forma similar, os processos mandibulares se fundem para formar a maxila inferior (rosa); d) Durante a sexta semana de embriogênese, o palato secundário se desenvolve com o crescimento bilateral dos processos maxilares, que crescem verticalmente ao lado da língua (verde); e) Em sequência as lâminas palatinas se elevam a uma posição horizontal sobre a língua, entrando em contato uma com a outra e começando a fusão; f) Por fim, temos a fusão das lâminas palatinas, dividindo o espaço oronasal em cavidades oral e nasal separadas (Mod. de DIXON *et al.*, 2011).

### 1.1.3. Classificação

As fissuras podem ser classificadas a depender da especialidade médica. Entre os cirurgiões, uma das classificações mais utilizadas é a de Spina e colaboradores (1972), que leva em consideração a embriologia das estruturas faciais divididas em palato primário e secundário, e sua convergência em torno do forâmen incisivo. Já entre os geneticistas, a forma mais usual de classificação das FL/P é o agrupamento em formas sindrômicas, quando outras anomalias estão presentes além da fissura, ou não sindrômicas (FL/P NS), quando estas ocorrem isoladamente. (MOSSEY *et al.*, 2009; PASSOS-BUENO *et al.*, 2010; PEGELOW *et al.*, 2008; WONG & HÄGG, 2004).

Já existem mais de 500 síndromes associadas à FL/P e, dentre elas, destaca-se a síndrome de van der Woude (SVW, OMIM #119300) pela frequência relativamente alta (cerca de 2% dos casos de fissura). A SVW distingue das formas não-sindrômicas apenas pela presença de fossetas no lábio inferior (presente em 85% dos casos) e hipodontia (presente em 25% dos casos), e, em muitos casos, pacientes sem essas características são indistinguíveis de indivíduos afetados por formas não-sindrômicas. O padrão de herança da síndrome é autossômico dominante com penetrância alta (89-99%, BURDICK *et al.*, 1985), e mutações no gene *IRF6* (*interferon regulatory factor 6*), presente na região cromossômica 1q32.2, têm sido associadas a casos de SVW (KONDO *et al.*, 2002). Uma forma alélica da SVW é a Síndrome do Pterigio Poplíteo (OMIM #119500), na qual além de comprometimento craniofacial pode haver envolvimento dos membros inferiores e superiores (LEES *et al.*, 1999). As formas não-sindrômicas correspondem a aproximadamente 70% dos casos de FL/P, e serão o foco do presente trabalho (MOSSEY *et al.*, 2009; PASSOS-BUENO *et al.*, 2010).

## **1.2. Fissura labial com ou sem fissura de palato não-sindrômica**

### **1.2.1. Epidemiologia**



A incidência da FL/P é de cerca de 1:700 nascimentos, com variação étnica e geográfica, sendo mais frequente em asiáticos e nativos americanos (3,6:1000), intermediária em populações europeias (1:1000) e menor em africanos (0,3:1000) (MOSSEY & CASTILLIA, 2003; VANDERAS, 1987). No Brasil, a prevalência de FL/P NS tem sido estimada em 0.28-1.54 a cada 1000 nascimentos (LOFFREDO *et al.*, 2001; MENEGOTTO & SALZANO, 1991).

O risco de recorrência para FL/P NS é calculado de forma empírica, e varia de acordo com alguns fatores. O risco de recorrência aumenta de acordo com o grau de parentesco em relação a um afetado, sendo maior para indivíduos de 1º grau (3,5%), diminuindo para 2º e 3º graus (0,8% e 0,6% respectivamente). O risco também difere com a gravidade do defeito, sendo que em fissura de lábio e palato unilateral (FLPU) é de 2,5%, aumentando para 4,6% quando se trata de fissura de lábio e palato bilateral (FLPB) (GROSEN *et al.*, 2010).

Esses dados, juntamente com fatores como altas taxas de agregação familiar, altas estimativas de herdabilidade (variando de 45 a 85% no Brasil) e elevadas taxas de concordância de gêmeos monozigóticos (40-60%) versus dizigóticos (3-5%), evidenciam um forte componente genético na etiologia da FL/P NS (BRITO *et al.*, 2011; CHRISTENSEN & FOGH-ANDERSEN, 1993; GROSEN *et al.*, 2010; HECHT *et al.*, 1991;).

### **1.2.2. Modelo de Herança - Genética e Ambiente**

O modelo de herança mais aceito é o multifatorial com efeito de limiar, isto é, a manifestação da doença resulta da interação entre diversos fatores genéticos e ambientais, de modo que ao atingir uma determinada concentração desses fatores de risco, ocorre a manifestação da doença (GROSEN *et al.*, 2010) (Figura 3).

O modelo multifatorial se aplica a traços quantitativos, onde há uma distribuição contínua do fenótipo (ex: altura, peso, colesterol), diferentemente da herança mendeliana, onde os fenótipos são distribuídos em classes distintas.

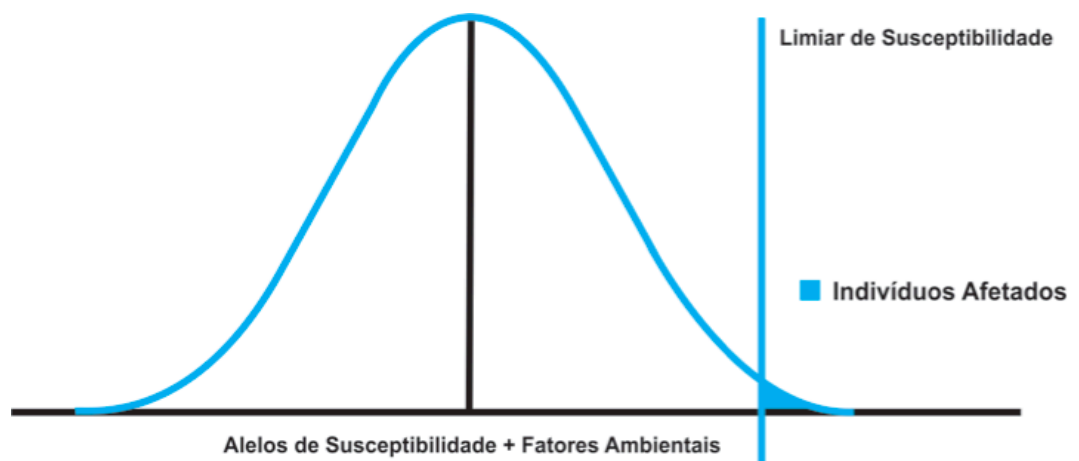


Figura 3: Modelo multifatorial com efeito de limiar. Curva de distribuição da susceptibilidade na população geral, composta por alelos de risco e fatores ambientais (Mod. de STRACHAN & READ, 1999).

Visto que a fissura ocorre no início do desenvolvimento embrionário, possui uma etiologia complexa e taxas de recorrência modestas, a identificação dos fatores de risco tem sido difícil (DIXON *et al.*, 2011).

### 1.2.3. Fatores de risco ambientais

Diversos fatores ambientais têm sido apontados como de predisposição à FL/P NS, porém a associação é inconsistente para a maioria deles. O fumo materno é o fator de risco mais consistente até o momento, e já foi associado a um aumento do risco de 30% (LITTLE *et al.*, 2002). Esse aumento no risco levanta a hipótese de que determinadas vias metabólicas estejam envolvidas no desenvolvimento de fissura. Neste contexto, observou-se associação entre variantes nos genes *GSTT1* (*glutathione s-transferase-θ1*) e *NOS3* (*nitric oxide synthase 3*) e susceptibilidade à FL/P NS na presença de fumo materno (SHAW *et al.*, 2005; SHI *et al.*, 2007; VAN ROOIJ *et al.*, 2001), porém a associação dessas variantes ainda é controversa (CHEVRIER *et al.*, 2008; MALLOY *et al.*, 1989; ROMITTI *et al.*, 1999).

O consumo materno de álcool também já foi associado a um aumento do risco de o feto desenvolver FL/P NS. Aparentemente, este aumento no risco está associado particularmente à presença de variante responsável pela metabolização lenta do álcool no gene *ADH1C* (álcool desidrogenase 1C) (BOYLES *et al.*, 2010; DEROO *et al.*, 2008).

A ingestão de ácido fólico já foi descrita como fator protetor na prevenção de FL/P NS (VAN ROOIJ *et al.*, 2004; WILCOX *et al.*, 2007), sendo que variantes maternas em genes relacionados ao metabolismo de ácido fólico já foram associadas a um aumento no risco de FL/P (BUFALINO *et al.*, 2010). Essas associações, porém, nem sempre são replicadas (BHASKAR *et al.*, 2011; BLANTON *et al.*, 2011; SHAW *et al.*, 2006).

Outros fatores, como deficiência de multivitaminas, obesidade materna e infecções já foram apontadas como fatores de risco, porém ainda não há consenso sobre a contribuição destes fatores na predisposição à FL/P NS (DIXON *et al.*, 2011; MOSSEY *et al.*, 2009).

Estes achados provêm evidência de que fatores ambientais e interações gene-ambiente são importantes para o desenvolvimento de FL/P NS, e estudos prospectivos com poder suficiente para detectar esses efeitos serão importantes para a elucidação desses fatores.

#### **1.2.4. Fatores de risco genéticos**

Além dos fatores ambientais, fatores genéticos estão envolvidos no risco à FL/P NS, segundo o modelo multifatorial. Algumas hipóteses foram levantadas a respeito da natureza desses fatores.

A hipótese doença comum - variante comum assume que doenças comuns são causadas por variantes comuns (*minor allele frequency*, MAF>5%), as quais individualmente possuem um efeito menor, porém, quando combinadas, conferem um grande risco à doença. O aparecimento dessas variantes teria ocorrido uma vez em um ancestral comum, as quais com o passar das gerações, tornaram-se

frequentes na população. Sendo frequentes, espera-se que seu efeito seja pequeno e cumulativo, a ponto de não terem sido removidas por seleção natural. Algumas variantes comuns de suscetibilidade às FL/P NS têm sido identificadas por meio de estudos de associação, como se verá a seguir.

Já a hipótese doença comum - variante rara assume a presença de variantes raras (MAF<1%), que conferem efeito moderado/alto ao risco da doença. Tais variantes raras seriam em sua maioria população-específica, recentemente derivadas na população (BODMER & BONILA, 2008; MARIAN *et al.*, 2012). Essa hipótese está começando a ser testada através de sequenciamentos de nova geração de exomas ou genomas inteiros de afetados por FL/P NS (LESLIE & MURRAY, 2012).

#### **1.2.5. Estudos de Associação**

Estudos de associação, nos quais são comparadas as frequências de variantes entre dois grupos de indivíduos (como casos e controles), têm sido considerados a melhor abordagem para a identificação de variantes comuns associadas a doenças multifatoriais. Eles podem ser realizados utilizando a abordagem de genes candidatos, na qual é necessário um conhecimento prévio da etiologia da doença para escolher um gene ou uma via a ser testada para associação. Essa abordagem foi inicialmente utilizada pelos pesquisadores, e resultou na identificação de genes como *TGF $\alpha$*  e *MSX1* (envolvidos na formação do lábio e palato em estudos em modelos animais, ARDINGER *et al.* 1989; SATOKATA & MAAS, 1994), *MTHFR* (envolvido no metabolismo do folato, TOLAROVA *et al.*, 1998), e *IRF6* (associado à SVW, forma sindrômica de fissura, ZUCCHERO *et al.*, 2004).

Recentemente, estudos de associação de genoma inteiro (GWAS – *Genome Wide Association Study*) vêm sendo utilizados, os quais são bastante interessantes devido à possibilidade de se testar o genoma sem necessidade de uma hipótese *a priori* de gene candidato, possibilitando assim a descoberta de novos *loci* e mecanismos (MARIAN *et al.*, 2012). O GWAS foi possibilitado devido a recentes

esforços de projetos como o HapMap (INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, 2003), que caracterizou, em diferentes populações, frequências de variantes genéticas de base única (SNVs – *single nucleotide variant*) e a estrutura de blocos haplotípicos ao longo do genoma. Aproximadamente 10 milhões de variantes comuns (MAF>5%) são transmitidas através das gerações em blocos haplotípicos, o que permite que alguns SNVs (chamados de *tagSNVs*) capturem a maioria da variação de cada bloco. A estrutura haplotípica do genoma, aliada aos rápidos avanços na tecnologia e constante queda dos custos dos *arrays* de genotipagem, tem permitido um avanço na cobertura do genoma de cada indivíduo, chegando a mais de um milhão de SNVs nos *arrays* atuais (HARDY & SINGLETON, 2009; MANOLIO, 2010).

#### **1.2.5.1 Loci associados à FL/P NS**

Considerando os estudos de associação realizados para FL/P NS, que incluem quatro GWAS, os principais *loci* associados a FL/P NS são o gene *IRF6* e as regiões 8q24.21 e 10q25.3, representados na Figura 4 (BIRNBAUN *et al.*, 2009a, MANGOLD *et al.*, 2009; ZUCCHERO *et al.*, 2004). Uma meta-análise recente dos dois maiores GWAS realizados para FL/P NS (BEATY *et al.*, 2010; MANGOLD *et al.*, 2009) culminou na identificação de seis novos *loci* (1p36, 2p21, 3p11.1, 8q21.3, 13q31.1, 15q22), sendo que 1p36 atingiu significância marginal um dos GWAS anteriores (BEATY *et al.*, 2010). Essa meta-análise também corroborou a associação de *loci* anteriormente identificados (1p22.1, 1q32.2 - *IRF6*, 8q24.21, 10q25, 17q22, 20q12) (LUDWIG *et al.*, 2012).

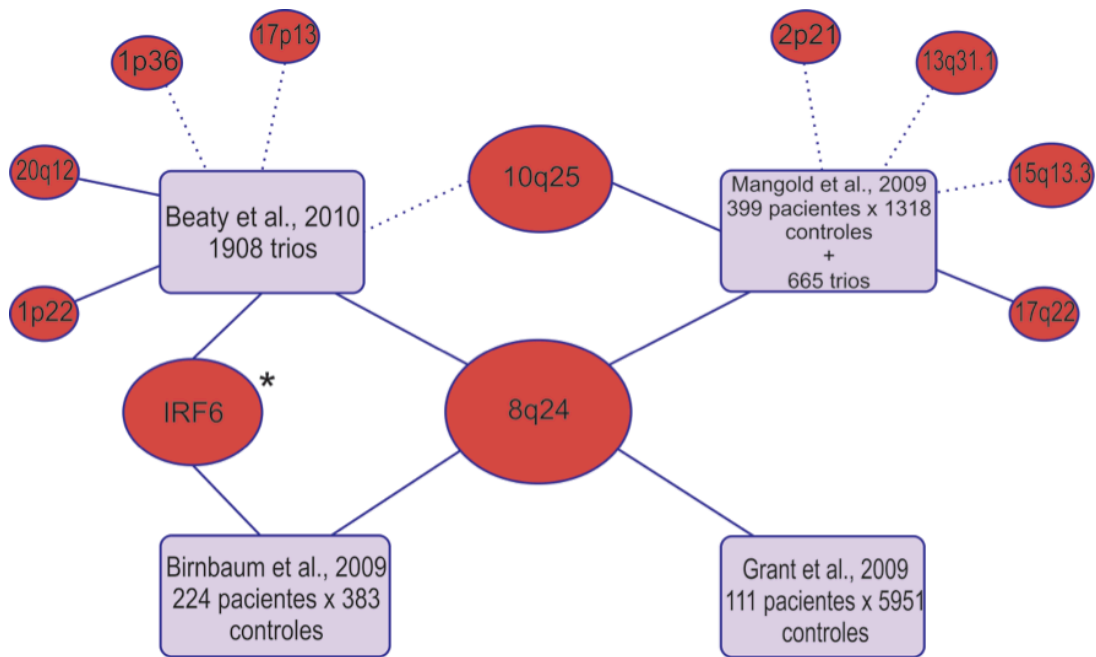


Figura 4: Diagrama representando os principais *loci* associados a FL/P NS por GWAS. Linhas pontilhadas representam associações marginais, enquanto linhas sólidas representam associações que são comumente aceitas em GWAS ( $p < 10^{-7}$ ). (\*) MANGOLD e colaboradores (2009) encontraram evidência de interação entre *IRF6* e *GREM1*, um gene localizado na região 15q13.3, na susceptibilidade a FL/P NS (Mod. de BRITO *et al.*, 2012c).

O primeiro estudo a sugerir que variações polimórficas no gene *IRF6* estavam associadas à predisposição a FL/P NS foi realizado por Zuccherro e colaboradores (2004). O gene *IRF6* foi considerado um gene candidato devido ao fato de ser responsável por uma forma sindrômica de FL/P (SVW) que possui uma grande sobreposição fenotípica com a FL/P NS. A associação de diversos SNVs de *IRF6* com a doença tem sido identificada e confirmada através de diversos estudos, incluindo GWAS (BEATY *et al.*, 2010a; BIRNBAUM *et al.*, 2009b; BLANTON *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2012a; GHASSIBÉ *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2009; JAGOMÄGI *et al.* 2010; LUDWIG *et al.*, 2012; PAN *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2007; PEGELOW *et al.*, 2008; RAHIMOV *et al.*, 2008; SCAPOLI *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2008).

A maioria das variantes de *IRF6* associadas à FL/P NS encontra-se em região não-codificante do gene, com um possível papel na regulação gênica ainda controverso. Rahimov e colaboradores (2008) identificaram o SNV rs642961 (G>A), localizado em um *enhancer* de *IRF6* (aproximadamente 10kb *upstream* do sítio de início de transcrição do gene). Essa variante altera o sítio de ligação com o fator de transcrição AP2 $\alpha$ , o qual, por sua vez, quando produzido em quantidades

insuficientes em decorrência de mutações patogênicas, causa a síndrome Branchiooculofacial (OMIM #113620), uma forma sindrômica de fissura (MILUNSKY *et al.*, 2008). Estes resultados sugerem que o SNV rs642961 seja uma variante funcional. De fato, o alelo de risco desse SNV (A) está associado à diminuição dos níveis de expressão de *IRF6* em tecido de lábio, embora não tenha sido detectada diferença nos níveis de expressão do gene repórter (luciferase) em cultura de queratinócitos (PAN *et al.*, 2010; RAHIMOV *et al.*, 2008).

Outros dois SNVs do gene *IRF6* associados a predisposição à FL/P NS foram também correlacionados com variações nos níveis de transcritos de *IRF6*: rs2236906 (T>G) e rs590223 (A>G). O primeiro está localizado no íntron 3 do gene *IRF6* (JUGESSUR *et al.*, 2009) e foi descrito como regulatório em culturas primárias de células T (DIMAS *et al.*, 2009). Já o rs590223 (A>G) está localizado no íntron 6 do gene *TRAF3IP3* (adjacente a 3' do *IRF6*) (JAGOMÄGI *et al.*, 2010) e altera os níveis de expressão do gene *IRF6* em amostras de fígado (SCHADT *et al.*, 2008).

Um GWAS realizado por Birnbaum e colaboradores (2009a) utilizando população europeia detectou associação entre FL/P NS e diversos SNVs na região 8q24.21, sendo que a variante com sinal de associação mais significativo é a rs987525. A região de associação ocupa uma extensão de 640kb (chr8:129,700,000–130,340,000, NCBI build 36.1). Este resultado tem sido replicado em diversos estudos, em sua maioria em populações de origem europeia (GRANT *et al.*, 2009; MOSTOWSKA *et al.*, 2010; NIKOPENSIUS *et al.*, 2009). A região de associação está localizada em um deserto gênico, o qual é flanqueado pelo proto-oncogene *PVT1* (localizado aproximadamente a 900kb *upstream* a rs987525) e pelo gene *LOC728724* (aproximadamente a 280kb *downstream* a rs987525), o qual é transcrito em um RNA não-codificante.

Já foi demonstrado que outra região no deserto gênico 8q24.21, fora do intervalo de associação com FL/P NS, possui um papel regulatório importante, contendo elementos regulatórios que controlam genes mais distantes, como *MYC* e *PVT1*, além de variantes associadas a diversos tipos de câncer (HUPPI *et al.*, 2012; SOTELLO *et al.*, 2010; WASSERMAN *et al.*, 2010).

Na região 10q25.3 quatro variantes foram associadas à FL/P NS, e ocupam uma extensão de 30kb. O principal gene candidato da região é o *VAX1*, um fator de

transcrição aparentemente envolvido no desenvolvimento do prosencéfalo, e está localizado a 53kb da região de associação (MANGOLD *et al.*, 2009). Camundongos homozigotos para mutações em *Vax1* apresentam malformações craniofaciais, incluindo fissura de palato (HALLONET *et al.*, 1999).

Ao contrário de *IRF6*, no qual um mecanismo molecular subjacente à variante rs642961 foi identificado, os papéis funcionais das regiões 8q24.21 e 10q25.3 na susceptibilidade à FL/P NS permanecem desconhecidos.

### 1.2.6. Expressão gênica nas doenças complexas

Apesar de diversos *loci* já terem sido identificados (BEATY *et al.*, 2010; BIRNBAUN *et al.*, 2009a; GRANT *et al.*, 2009; LUDWIG *et al.*, 2012; MANGOLD *et al.*, 2009), estes não explicam totalmente a herdabilidade da FL/P NS. Os altos níveis de significância dos sinais de associação ainda precisam ser traduzidos em um entendimento completo dos genes ou elementos genéticos dos *loci* que estão mediando a susceptibilidade à doença.

É interessante notar que, diferentemente das doenças mendelianas, nas quais as mutações geralmente afetam a estrutura das proteínas, nas doenças complexas a grande maioria das variantes associadas encontra-se em regiões não-codificantes, o que sugere que os mecanismos subjacentes à susceptibilidade às doenças complexas envolvem segmentos genômicos envolvidos com regulação da expressão gênica (HINDORFF *et al.*, 2009).

Os níveis de expressão gênica são caracteres quantitativos e herdáveis, e um dos mecanismos que modula esses níveis de expressão são variantes presentes no DNA em regiões regulatórias (CHEUNG *et al.*, 2003; HARDY & SINGLETON, 2009; SCHADT *et al.*, 2003;). Esses *loci* associados a traços quantitativos de expressão, denominados eQTLs (*expression quantitative trait loci*), podem ser mapeados ao longo do genoma e podem ajudar na elucidação dos mecanismos de susceptibilidade à doença, identificando regiões do genoma com efeito funcional na expressão gênica (SCHADT *et al.*, 2003, 2008). Essas podem ser regiões candidatas para verificação da



associação com a doença, auxiliando assim no entendimento do papel das variantes na etiologia da doença.

A variação da expressão gênica é um importante mecanismo de susceptibilidade a doenças complexas, e diversos trabalhos já obtiveram sucesso ao aliar estudos de associação e eQTLs como estratégia para identificação de novos *loci* de risco, como já demonstrado para diversas doenças como esquizofrenia, asma e doença de Crohn (DE JONG *et al.*, 2012; FRANSEN *et al.*, 2010; LIBIOULLE *et al.*, 2007; MOFFAT *et al.* 2007). Para asma, diversos SNVs apresentando forte associação com a doença foram detectados em uma região de 206 kb na região 17q21. Essas variantes estão relacionadas à variação nos níveis de transcrição do gene *ORMDL3*, o qual pertence a uma classe de genes que codifica proteínas transmembrana ancoradas ao retículo endoplasmático, porém de função desconhecida (MOFFATT *et al.*, 2007). O papel regulatório dessas variantes indica que a variação na expressão desse gene está envolvida na susceptibilidade à asma. O mesmo acontece para doença de Crohn, onde uma região de associação de 1,25 Mb em um deserto gênico na região 5p13.1 está correlacionada com os níveis de expressão do gene *PTGER4*, um receptor de prostaglandina, para o qual camundongos *knock-out* desenvolvem colite (LIBIOULLE *et al.*, 2007).

Estudos já demonstraram que há um enriquecimento de eQTLs dentre os *loci* associados a doenças complexas (KNIGHT, 2005; NICA *et al.*, 2010; NICOLAE *et al.*, 2010), e também já foi observado que eQTLs mapeados em tecidos envolvidos na doença estão enriquecidos de variantes associadas à mesma, o que reforça a importância de integrar as duas abordagens, utilizando, se possível um tecido acometido pela doença (DING *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2012a,b; RICHARDS *et al.*, 2012).

Para FL/P NS, as variantes com maior evidência de associação com a doença, rs641961 (gene *IRF6*) e rs987525 (*locus* 8q24.21), estão localizadas em regiões não-codificantes do genoma, o que sugere que a variação na expressão gênica também seja importante para susceptibilidade à FL/P NS, como já mencionado acima.

### 1.3. Objetivos

Conforme explicitado, a integração das abordagens de estudo de associação e mapeamento de eQTLs é uma ferramenta promissora na elucidação da etiologia de doenças complexas, visto que propicia descobertas de novas vias biológicas e entendimento funcional das variantes já associadas.

O objetivo principal do presente trabalho é elucidar o papel de variantes na etiologia da FL/P NS. Para tanto, desenvolvemos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Verificar se variantes previamente associadas à fissura possuem um papel regulatório em células-tronco mesenquimais provenientes de músculo orbicular do lábio (OOMMSC) de pacientes FL/P NS;
- 2) Verificar se eQTLs mapeados em OOMMSC de pacientes FL/P NS estão associados à doença.

## Capítulo 5. Discussão Geral e Conclusões

---

Com o advento dos estudos de associação de genoma inteiro, diversas variantes têm sido associadas à FL/P NS. Entretanto, a contribuição biológica de cada um desses *loci* para a determinação da susceptibilidade à doença ainda é pouco esclarecida. A elucidação de funções biológicas chave envolvidas na susceptibilidade à doença provê um importante avanço para um completo entendimento da etiologia da doença.

A integração de dados de expressão gênica com resultados de estudos de associação pode ser informativa para auxiliar na descoberta de genes e vias biológicas envolvidas na susceptibilidade à doença. Visto que há um enriquecimento de eQTLs dentre variantes associadas a doenças complexas (KNIGHT, 2005; NICA *et al.*, 2010; NICOLAE *et al.*, 2010), e enriquecimento de variantes associadas a doenças complexas dentre eQTLs tecido-específicos (DING *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2012a,b; RICHARDS *et al.*, 2012), o presente trabalho integra estudo de associação e análise de eQTLs de duas maneiras: (1) verificando se variantes associadas à FL/P NS possuem efeito regulatório em células-tronco de músculo orbicular do lábio (OOMMSC), e (2) verificando se eQTLs mapeados em OOMMSC estão associados à FL/P NS.

Alguns trabalhos já demonstraram a utilidade da integração das abordagens de estudos de associação e eQTLs na elucidação da etiologia de doenças complexas, porém nenhum foi realizado para FL/P NS. Fransen e colaboradores (2010) utilizaram como estratégia para a descoberta de *loci* associados à doença de Crohn a priorização dos SNVs com base no seu efeito funcional. Dentre as 500 variantes com maior sinal de associação, selecionaram para uma análise subsequente aquelas que tinham correlação com níveis de expressão. Essa abordagem culminou na identificação de dois novos genes de risco para a doença: *UBE2L3* e *BCL3*. *UBE2L3* já foi associado a outras doença auto-imunes (doença celíaca, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico, DUBOIS *et al.*, 2010; HAN *et al.*, 2009; STAHL *et al.*, 2010), as quais sabidamente compartilham *loci* de risco com a doença de Crohn. O

eQTL de *UBE2L3* associado à doença está correlacionado a maiores níveis de expressão do mesmo gene. Teoricamente, uma superexpressão de *UBE2L3* poderia levar a uma degradação mais rápida do precursor de NF-κB, e assim a uma menor produção de NF-κB, conseqüentemente diminuindo a resposta imune inata. Um efeito similar é visto para de variantes de risco do gene *NOD2*, o *locus* com maior risco para doença de Crohn. Dessa forma, essa estratégia se mostrou válida para a identificação de *loci* de risco que tenham um efeito funcional para a doença.

eQTLs são em sua maioria tecido-específicos (69-80%, DIMAS *et al.*, 2009), o que corrobora a importância de estudar expressão gênica em um tecido afetado pela doença. Sendo assim, escolhemos utilizar células-tronco mesenquimais de músculo orbicular do lábio (OOMMSC), o qual é um tecido afetado na doença, mesmo em formas subclínicas (WEINBERG *et al.*, 2008). Visto que a formação do lábio e palato ocorre entre a quarta e sexta semanas de gestação (GORLIN *et al.*, 2001), esse tipo celular seria o representante disponível mais próximo de uma célula embrionária, proveniente de um tecido afetado pela doença, o que o torna um modelo interessante para o estudo de FL/P NS.

Porém, ao analisar as variantes rs642961, rs590223 e rs987525, já associadas à FL/P NS e com papel regulatório anteriormente sugerido, não observamos correlação entre genótipo e níveis de expressão dos genes analisados. Isso pode ser devido ao pequeno número amostral analisado (N=46), uma vez que a frequência do alelo de menor frequência desses SNPs é 17,19% (A), 34% (G), 32,47% (A), respectivamente. Alternativamente, é possível que essas variantes somente interfiram em momentos críticos do desenvolvimento embrionário, sendo necessário observar os níveis de expressão em células embrionárias envolvidas na formação das estruturas orofaciais afetadas nas FL/P. Para isso, uma alternativa seria o uso da reprogramação celular (iPSC, *induced Pluripotent Stem Cells*, TAKAHASHI *et al.*, 2007), o que permitiria avaliar a expressão gênica de células indiferenciadas do próprio paciente, as quais tem potencial de originar as estruturas embrionárias afetadas na doença.s

Ao verificar se variantes regulatórias estariam associadas à FL/P NS, utilizamos eQTLs mapeados em OOMMSC provenientes de um projeto de pós-doutorado realizado no nosso grupo, o qual mapeou 119 eQTLs, relacionados a 18

genes ( $p < 0.0001$ ; FDR=14%; Masotti *et al.*, manuscrito em preparação). Para o estudo de associação, não priorizamos os eQTLs mais significantes; escolhemos aqueles localizados em regiões genômicas com associação prévia à doença ou que estivessem correlacionados com genes de desenvolvimento, conforme explicitado no Capítulo 4.

Não detectamos associação de nenhuma das cinco variantes testadas com FL/P NS, as quais não foram associadas a nenhum outro fenótipo por GWAS (Disponível em: [www.genome.gov/gwastudies](http://www.genome.gov/gwastudies)). Isso pode ter sido devido à significância marginal dos eQTLs escolhidos para estudo de associação caso-controle (FDR>42.5%). Além disso, a casuística utilizada (N=46) para o mapeamento é bastante pequena em comparação com estudos de eQTLs que vêm sendo realizados (GRUNDBERG *et al.*, 2012). Em estudos com baixo poder, os eQTLs detectados são aqueles de maior efeito, e esses geralmente são compartilhados entre diferentes tecidos (NICA *et al.*, 2011; GRUNDBERG *et al.*, 2012). Sendo assim, esses cinco eQTLs, podem não ter relevância para a doença em si.

O presente trabalho vem a contribuir com a integração das abordagens de estudo de associação e eQTLs pela primeira vez em FL/P NS. Essa integração já demonstrou sucesso para outras doenças e nossos resultados ainda não são conclusivos para FL/P NS. Para julgarmos a relevância dessa abordagem para a identificação de variantes de suscetibilidade para a doença, está em andamento o estudo de associação do tipo caso-controle para outros eQTLs de OOMMSC. Cem eQTLs foram escolhidos e priorizamos aqueles mais significantes. Além disso, escolhemos eQTLs que regulam genes associados à FL/P NS que por sua vez também estão associados a módulos de co-expressão gênica correlacionados à variabilidade clínica de FL/P NS (MASOTTI *et al.*, manuscrito em preparação). Ainda, testaremos eQTLs que regulam ou que estão localizados em regiões regulatórias de genes associados a vias de reparo de dano de DNA, recentemente relacionada à FL/P NS por nosso grupo (KOBAYASHI *et al.*, manuscrito submetido).

## Referências Bibliográficas

---

ARDINGER, H. H.; BUETOW, K. H.; BELL, G. I.; BARDACH, J.; VAN DEMARK, D. R.; MURRAY, D. R. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. **American Journal of Human Genetics**. v. 45, n. 3, p. 348–353, 1989.

BEATY, T.; MURRAY, J.; MARAZITA, M. MUNGER, R. .; RUCZINSKI, I.; HETMANSKI, J.; LIANG, K.; WU, T.; MURRAY, T.; FALLIN, M.; REDETT, R.; RAYMOND, G.; SCHWENDER, H.; JIN, S.; COOPER, M.; DUNNWARD, M.; MANSILLA, M.; LESLIE, E.; BULLARD, S.; LIDRAL, A.; MORENO, L.; MENEZES, R.; VIEIRA, A.; PETRIN, A.; WILCOX, A.; LIE, R.; JABS, E.; WU-CHOU, Y.; CHEN, P.; WANG, H.; YE, X.; HUANG, S.; YEOW, V.; CHONG, S.; JEE, S.; SHI, B.; CHRISTENSEN, K.; MELBYE, M.; DOHENY, K.; PUGH, E.; LING, H.; CASTILLA, E.; CZEIZEL, A.; MA, L.; FIELD, L.; BRODY, L.; PANGILINAN, F.; MILLS, J.; MOLLOY, A.; KIRKE, P.; SCOTT, J.; ARCOS-BURGOS, M.; SCOTT, A. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. **Nature Genetics**. v. 42, n. 6, p. 525-529, 2010.

BLANTON, S.; CORTEZ, A.; STAL, S.; MULLIKEN, J.; FINNELL, R.; HECHT, J. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. **American Journal of Medical Genetics**, v. 137, p. 259–262, 2005.

BHASKAR, L. V.; MURTHY, J.; VENKATESH BABU, G. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. **Arch Oral Biol**. v. 56, n. 8, p. 723-37, 2011.

BIRNBAUM, S.; LUDWIG, K.; REUTTER, H.; HERMS, S.; STEFFENS, M.; RUBINI, M.; BALUARDO, C.; FERRIAN, M.; ASSIS, N.; ALBLAS, M.; BARTH, S.; FREUDENBERG, J.; LAUSTER, C.; SCHMIDT, G.; SCHEER, M.; BRAUMANN, B.; BERGÉ, S.; REICH, R.; SCHIEFKE, F.; HEMPRICH, A.; POTZSCH, S.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.; POTZSCH, B.; MOEBUS, S.; HORSTHEMKE, B.; KRAMER, F.; WIENKER, T.; MOSSEY, P.; PROPPING, P.; CICHON, S.; HOFFMAN, P.; KNAPP, M.; NOTHEN, M.; MANGOLD, E. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. **Nature Genetics**. v. 41, n. 4, p. 473-477, 2009a.

BIRNBAUM, S.; LUDWIG, K.; REUTTER, H.; HERMS, S.; DE ASSIS, N. A.; DIAZ-LACAVALA, 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. IRF6 gene

variants in Central European patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. **Eur J Oral Sci.** v. 117, p. 766-769, 2009b.

BLANTON, S. H.; HENRY, R. R.; YUAN, Q.; MULLIKEN, J. B.; STAL, S.; FINNELL, R. H.; HECHT, J. T. Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.** v. 91, n. 1, p. 50-60, 2011.

BODMER, W.; BONILLA, C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. **Nat. Genet.** v. 40, n. 6, p. 695-701, 2008

BOYLES, A. L.; DEROO, L. A.; LIE, R. T.; TAYLOR, J. A.; JUGESSUR, A.; MURRAY, J. C.; WILCOX, A. J. Maternal alcohol consumption, alcohol metabolism genes, and the risk of oral clefts: a population-based case-control study in Norway, 1996–2001. **Am. J. Epidemiol.** v. 172, p. 924–931, 2010.

BRITO, L. A.; CRUZ, L. A.; ROCHA, K. M.; BÁRBARA, L. K.; SILVA, C. B. F.; BUENO, D. F.; AGUENA, M.; BERTOLA, D. R.; FRANCO, D.; COSTA, A. M.; ALONSO, N.; OTTO, P. A.; PASSOS-BUENO, M. R. 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.** v.155, p.1581–1587, 2011.

BRITO, L. A.; BASSI, C.; F. S.; MASOTTI, C.; MALCHER, C.; ROCHA, K. M.; SCHLESINGER, D.; BUENO, D. F.; CRUZ, L. A.; BÁRBARA, L. K.; BERTOLA, D. R.; MEYER, D.; FRANCO, D.; ALONSO, N.; PASSOS-BUENO, M. R. IRF6 is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population. **American Journal of Medical Genetics: Part A.** v. 158A, p. 2170–2175, 2012a.

BRITO, L. A.; PARANAIBA, L. M.; BASSI, C. F. S.; MASOTTI, C.; MALCHER, C.; SCHLESINGER, D.; ROCHA, K., M.; CRUZ, L. A.; BÁRBARA, L. K.; ALONSO, N.; FRANCO, D.; BAGORDAKIS, E.; MARTELLI JÚNIOR, H.; MEYER, D.; COLETTA, R. D.; PASSOS-BUENO, M. R. Region 8q24 is a susceptibility locus for nonsyndromic oral clefting in Brazil. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology.** v. 94, p. 464-468, 2012b.

BRITO, A. B.; MEIRA, J. G. C.; KOBAYASHI, G. S.; PASSOS-BUENO, M. R. Genetics and Management of the Patient with Orofacial Cleft. **Plast Surg Int.** 2012c.

BUFALINO, A.; RIBEIRO, PARANAÍBA, L. M.; NASCIMENTO DE AQUINO, S.; MARTELLI-JÚNIOR, H.; OLIVEIRA SWERTS, M. S.; COLETTA, R. D. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. **Birth Defects Res Part A.** v. 88, p. 980–6, 2010.

BURDICK, A. B.; BIXLER, D.; PUCKETT, C. I. Genetic analysis in families with Van Der Woude syndrome. **Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology**. v. 5, n. 2, p. 181–208, 1985.

CHEUNG, V. G.; CONLIN, L. K.; WEBER, T. M.; ARCARO, M.; JEN, K.; MORLEY, M.; SPIELMAN, R. S. Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. **Nat. Genet.** v. 33, p. 422–425, 2003.

CHEVRIER, C.; BAHUAU, M.; PERRET, C.; IOVANNISCI, D. M.; NELVA, A.; HERMAN, C.; VAZQUEZ, M. P.; FRANCCANNET, C.; ROBERT-GNANSIA, E.; LAMMER, E. J.; CORDIER S. Genetic susceptibilities in the association between maternal exposure to tobacco smoke and the risk of nonsyndromic oral cleft. **Am J Med Genet A**. v. 146A, n. 18, p. 2396-406, 2008.

CHRISTENSEN, K.; FOGH-ANDERSEN, P. Cleft lip (+/- cleft palate) in Danish twins. **Am J Med Genet**. v. 47, p. 10-916, 1993.

DE JONG, S.; VAN EIJK, K. R.; ZEEGERS, D. W.; STRENGMAN, E.; JANSON, E.; VELDINK, J. H.; VAN DEN BERG, L. H.; CAHN, W.; KAHN, R. S.; BOKS, M. P. M.; OPHOFF, R. A.; THE PGC SCHIZOPHRENIA (GWAS) CONSORTIUM. Expression QTL analysis of top loci from GWAS meta-analysis highlights additional schizophrenia candidate genes. **European Journal of Human Genetics**. v. 20, p. 1004–1008, 2012.

DEROO, L. A.; WILCOX, A. J.; DREVON, C. A.; LIE, R. T. First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. **Am. J. Epidemiol.** v. 168, p. 638–646, 2008.

DIMAS, A.; DEUTSCH, S.; STRANGER, B.; MONTGOMERY, S.; BOREL, C.; ATTAR-COHEN, H.; INGLE, C.; BEAZLEY, C.; ARCELUS, M.; SEKOWSKA, M.; GAGNEBIN, M.; NISBETT, J.; DELOUKAS, P.; DERMITZAKIS, E.; ANTONARAKIS, S. Common regulatory variation impacts gene expression in a cell type-dependent manner. **Science**. v. 325, p. 1246-1250, 2009.

DING, J.; GUDJONSSON, J. E.; LIANG, L.; STUART, P. E.; LI, Y.; CHEN, W.; WEICHTHAL, M.; ELLINGHAUS, E.; FRANKE, A.; COOKSON, W.; NAIR, R. P.; ELDER, J. T.; ABECASIS, G. R. Gene expression in skin and lymphoblastoid cells: refined statistical method reveals extensive overlap in cis-eQTL signals. **Am J Hum Genet**. v. 87, p. 779–789, 2010.



DIXON, M.; MARAZITA, M.; BEATY T.; MURRAY J. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. **Nat Rev Genet**, v. 12, p.167-178, 2011.

DUBOIS, P. C.; TRYNKA, G.; FRANKE, L.; HUNT, K. A.; ROMANOS, J.; CURTOTTI, A.; ZHERNAKOVA, A.; HEAP, G. A.; ADÁNY, R.; AROMAA, A.; BARDELLA, M. T.; VAN DEN BERG, L. H.; BOCKETT, N. A.; DE LA CONCHA, E. G.; DEMA, B.; FEHRMANN, R. S.; FERNÁNDEZ-ARQUERO, M.; FIATAL, S.; GRANDONE, E.; GREEN, P. M.; GROEN, H. J.; GWILLIAM, R.; HOUWEN, R. H.; HUNT, S. E.; KAUKINEN, K.; KELLEHER, D.; KORPONAY-SZABO, I.; KURPPA, K.; MACMATHUNA, P.; MÄKI, M.; MAZZILLI, M. C.; MCCANN, O. T.; MEARIN, M. L.; MEIN, C. A.; MIRZA, M. M.; MISTRY, V.; MORA, B.; MORLEY, K. I.; MULDER, C. J.; MURRAY, J. A.; NÚÑEZ, C.; OOSTEROM, E.; OPHOFF, R. A.; POLANCO, I.; PELTONEN, L.; PLATTEEL, M.; RYBAK, A.; SALOMAA, V.; SCHWEIZER, J. J.; SPERANDEO, M. P.; TACK, G. J.; TURNER, G.; VELDINK, J. H.; VERBEEK, W. H.; WEERSMA, R. K.; WOLTERS, V. M.; URCELAY, E.; CUKROWSKA, B.; GRECO, L.; NEUHAUSEN, S. L.; MCMANUS, R.; BARISANI, D.; DELOUKAS, P.; BARRETT, J. C.; SAAVALAINEN, P.; WIJMENGA, C.; VAN HEEL, D. A. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat. Genet.* v. 42, n. 4, p. 295 – 302, 2010.

FRANSEN, K.; VISSCHEDIJK, M. C.; VAN SOMMEREN, S.; FU, J. Y.; FRANKE, L.; FESTEN, E. A. M.; STOKKERS, P. C. F.; VAN BODEGRAVEN, A. A.; CRUSIUS, J. B. A.; HOMMES, D. W.; ZANEN, P.; DE JONG, D. J.; WIJMENGA, C.; VAN DIEMEN, C. C.; WEERSMA, R. K. Analysis of SNPs with an effect on gene expression identifies UBE2L3 and BCL3 as potential new risk genes for Crohn's disease. **Human Molecular Genetics**. v. 19, n. 17, 2010.

G Hassibé, M.; Bayet, B.; Revencu, N.; Verellen-Dumoulin, C.; Gillerot, Y.; Vanwijck, R.; Vikkula, M. 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**. v. 13, p. 1239–1242, 2005.

Gorlin, R.; Cohen, M.; Hennekam, R. Orofacial Clefting Syndromes: General Aspects In:\_\_\_\_\_. **Syndromes of the head and neck**. Oxford: Oxford University Press, 2001. Cap. 20, p. 850.

Grant, S.; Wang, K.; Zhang, H.; Glaberson, W.; Annaiah, K.; Kim, C.; Bradfield, J.; Glessner, J.; Thomas, K.; Garris, M.; Frackelton, E.; Otieno, F. George, C.; Rosetta, M.; Nah, H.; Kirschner, R.; Hakonarson, H. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. **The Journal of pediatrics**. v. 155, n. 6, p. 909-13, 2009.

Grosen, D.; Chevrier, C.; Skytthe, A.; Bille, C.; Mølsted, K.; Sivertsen, A.; Murray, J.; Christensen, K. A cohort study of recurrence patterns among more

than 54 000 relatives of oral cleft cases in Denmark : support for the multifactorial threshold model of inheritance. **J Med Genet.** v. 47, p. 162-168, 2010.

GRUNDBERG, E.; SMALL, K. S.; HEDMAN, Å. K.; NICA, A. C.; BUIL, A.; KEILDSON, S.; BELL, J. T.; YANG, T. P.; MEDURI, E.; BARRETT, A.; NISBETT, J.; SEKOWSKA, M.; WILK, A.; SHIN, S. Y.; GLASS, D.; TRAVERS, M.; MIN, J. L.; RING, S.; HO, K.; THORLEIFSSON, G.; KONG, A.; THORSTEINDOTTIR, U.; AINALI, C.; DIMAS, A. S.; HASSANALI, N.; INGLE, C.; KNOWLES, D.; KRESTYANINOVA, M.; LOWE, C. E.; DI MEGLIO, P.; MONTGOMERY, S. B.; PARTS, L.; POTTER, S.; SURDULESCU, G.; TSAPROUNI, L.; TSOKA, S.; BATAILLE, V.; DURBIN, R.; NESTLE, F. O.; O'RAHILLY, S.; SORANZO, N.; LINDGREN, C. M.; ZONDERVAN, K. T.; AHMADI, K. R.; SCHADT, E. E.; STEFANSSON, K.; SMITH, G. D.; MCCARTHY, M. I.; DELOUKAS, P.; DERMITZAKIS, E. T.; SPECTOR, T. D.; MULTIPLE TISSUE HUMAN EXPRESSION RESOURCE (MUTHER) CONSORTIUM. Mapping cis- and trans-regulatory effects across multiple tissues in twins. **Nat Genet.** v. 44, n. 10, p. 1084-9, 2012.

HARDY, J.; SINGLETON, A. Genomewide Association Studies and Human Disease. **The New England Journal of Medicine.** v. 360, n. 17, p. 1759-1768, 2009.

HECHT, J.; YANG, P.; MICHELST, V.; BUETOWT, K. Complex Segregation Analysis of Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. **Am. J. Hum. Genet.** v. 49, p. 674-681, 1991.

HINDORFF, L. A.; SETHUPATHY, P.; JUNKINS, H. A.; RAMOS, E. M.; MEHTA, J. P.; COLLINS, F. S.; MANOLIO, T.A. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. **PNAS.** v. 106, n. 23, p. 9362-9367, 2009.

HAN, J. W.; ZHENG, H. F.; CUI, Y.; SUN, L. D.; YE, D. Q.; HU, Z.; XU, J. H.; CAI, Z. M.; HUANG, W.; ZHAO, G. P.; XIE, H. F.; FANG, H.; LU, Q. J.; XU, J. H.; LI, X. P.; PAN, Y. F.; DENG, D. Q.; ZENG, F. Q.; YE, Z. Z.; ZHANG, X. Y.; WANG, Q. W.; HAO, F.; MA, L.; ZUO, X. B.; ZHOU, F. S.; DU, W. H.; CHENG, Y. L.; YANG, J. Q.; SHEN, S. K.; LI, J.; SHENG, Y. J.; ZUO, X. X.; ZHU, W. F.; GAO, F.; ZHANG, P. L.; GUO, Q.; LI, B.; GAO, M.; XIAO, F. L.; QUAN, C.; ZHANG, C.; ZHANG, Z.; ZHU, K. J.; LI, Y.; HU, D. Y.; LU, W. S.; HUANG, J. L.; LIU, S. X.; LI, H.; REN, Y. Q.; WANG, Z. X.; YANG, C. J.; WANG, P. G.; ZHOU, W. M.; LV, Y. M.; ZHANG, A. P.; ZHANG, S. Q.; LIN, D.; LI, Y.; LOW, H. Q.; SHEN, M.; ZHAI, Z. F.; WANG, Y.; ZHANG, F. Y.; YANG, S.; LIU, J. J.; ZHANG, X. J. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. **Nat. Genet.** v. 41, n. 11, p. 1234-1237, 2009.

HUANG, Y.; WU, J.; MA, J.; BEATY, T.; SULL, J.; ZHU, L.; LU, D.; WANG, Y.; MENG, T.; SHI, B. Association between IRF6 SNPs and Oral Clefts in West China. **Journal of Dental Research**. v. 88, n. 8, p. 715-718, 2009.

HUPPI, K.; PITT, J. J.; WAHLBERG, B. M.; CAPLEN, N. J. The 8q24 gene desert: an oasis of non-coding transcriptional activity. **Frontiers in Genetics**. v. 3, n. 69, 2012.

INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. The International HapMap Project. **Nature**. v. 426, n. 6968, p. 789-96, 2003.

JAGOMÄGI, T.; NIKOPENSIUS, T.; KRJUTSKOV, K.; TAMMEKIVI, V.; VILTROP, T.; SAAG, M.; METSPALU, A. MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. **European journal of oral sciences**. v. 118, p. 213–220, 2010.

JUGESSUR, A.; GJESSING, K.; LIE, R.; WILCOX, A.; SHI, M.; WEINBERG, C.; CHRISTENSEN, K.; BOYLES, A.; DAACK-HIRSCH, S.; NGUYEN, T.; BILLE, C.; LIDRAL, A.; MURRAY, J. GENETIC Determinants of Facial Clefting : Analysis of 357 Candidate Genes Using Two National Cleft Studies from Scandinavia. **PLoS ONE**. v. 4, n. 4, 2009.  
KANG H. P.; MORGAN, A.A.; CHEN, R.; SCHADT, E. E.; BUTTE, A J. Coanalysis of GWAS with eQTLs reveals disease-tissue associations. **AMIA Summits Transl Sci Proc**. v. 2012 p. 35–41, 2012a.

KANG, H. P.; YANG, X.; CHEN, R.; ZHANG, B.; CORONA, E.; SCHADT, E. E.; BUTTE, A. J. Integration of disease-specific single nucleotide polymorphisms, expression quantitative trait loci and coexpression networks reveal novel candidate genes for type 2 diabetes. **Diabetologia**. v. 55, p. 2205–2213, 2012b.

KNIGHT, J. C. Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. **J Mol Med**. v. 83, p. 97–109, 2005.

KONDO, S.; SCHUTTE, B.; RICHARDSON, R.; BJORK, B.; KNIGHT, A.; WATANABE, Y.; HOWARD, E.; FERREIRA, R.; DAACK-HIRSCH, S.; SANDER, A.; MCDONALD-MCGINN, D.; ZACKAI, E.; LAMMER, E.; AYLSWORTH, A.; ARDINGER, H.; LIDRAL, A.; POBER, B.; MORENO, L.; ARCOS-BURGOS, M.; VALENCIA, C.; HOUDAYER, C.; BAHUAU, M.; MORETTI-FERREIRA, D.; RICHIERI-COSTA, A.; DIXON, M.; MURRAY, J. Mutations In *IRF6* cause Van Der Woude And Popliteal Pterygium Syndromes. **Nature Genetics**. V. 32, P. 285-289, 2002.

LEES, M.; WINTER, R.; MALCOLM, S.; SAAL, H.; CHITTY, L. Popliteal pterygium syndrome: a clinical study of three families and report of linkage to the Van der

Woude syndrome locus on 1q32. **Journal of Medical Genetics**. v. 36, p. 888–892, 1999.

LESLIE, E.; MURRAY, J. Evaluating rare coding variants as contributing causes to non-syndromic cleft lip and palate. **Clin Genet**. 2012 [Epub ahead of print].

LIBIOULLE, C.; LOUIS, E.; HANSOUL, S.; SANDOR, C.; FARNIR, F.; FRANCHIMONT, D.; VERMEIRE, S.; DEWIT, O.; DE VOS, M.; DIXON, A.; DEMARCHE, B.; GUT, I.; HEATH, S.; FOGLIO, M.; LIANG, L.; LAUKENS, D.; MNI, M.; ZELENKA, D.; VAN GOSSUM, A.; RUTGEERTS, P.; BELAICHE, J.; LATHROP, M.; GEORGES, M. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. **PLoS Genet**. v. 3, n 4, p. 538-543, 2007.

LITTLE, J.; CARDY, A.; MUNGER, R. G. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. **Bull. World Health Organ**. v. 82, p. 213–218, 2002.

LOFFREDO, L. C. M.; FREITAS, J. A. S.; GRIGOLLI, A. A. G. Prevalence of oral clefts from 1975 to 1994, Brazil. **Rev Saúde Pública**. v.35, n.6, p.571-5. 2001.

LUDWIG, K. U.; MANGOLD, E.; HERMS, S.; NOWAK, S.; REUTTER, H.; PAUL, A.; BECKER, J.; HERBERZ, R.; ALCHAWA, T.; NASSER, E.; BÖHMER, A. C.; MATTHEISEN, M.; ALBLAS, M. A.; BARTH, S.; KLUCK, N.; LAUSTER, C.; BRAUMANN, B.; REICH, R. H.; HEMPRICH, A.; PÖTZSCH, S.; BLAUMEISER, B.; DARATSIANOS, N.; KREUSCH, T.; MURRAY, J. C.; MARAZITA, M. L.; RUCZINSKI, I.; SCOTT, A. F.; BEATY, T. H.; KRAMER, F.; WIENKER, T. F.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; RUBINI, M.; MOSSEY, P. A.; HOFFMANN, P.; LANGE, C.; CICHON, S.; PROPPING, P.; KNAPP, M.; NÖTHEN, M. M. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. **Nature Genetics**. v. 44, n. 9, p. 968-971, 2012.

MALLOY, M. H.; KLEINMAN, J. C.; BAKEWELL, J. M.; SCHRAMM, W. F.; LAND, G. H. Maternal smoking during pregnancy: No association with congenital malformations in Missouri 1980-83. **Am J Public Health**. v. 79, p. 1234-6, 1989.

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. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. **Nat Genet**. v. 42, n. 1, p. 24-6, 2009.

MANOLIO, T. A. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. **The New England Journal of Medicine**. v. 363, p. 166-76, 2010.

MARIAN, A. Molecular genetic studies of complex phenotypes. **Translational Research**. v. 159, n. 2, p. 64-78, 2012.

MENEGOTTO, B. G.; SALZANO, F. M. Epidemiology of oral clefts in a large South American sample. **Cleft Palate Craniofac J**, v.28, n.4, p.373-6, 1991.

MILUNSKY, J. M.; MAHER, T. A.; ZHAO, G.; ROBERTS, A. E.; STALKER, H. J.; ZORI, R. T.; BURCH, M. N.; CLEMENS, M.; MULLIKEN, J. B.; SMITH, R.; LIN, A. E. TFAP2A mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. **Am. J. Hum. Genet.** 82, 1171–1177 (2008).

MOFFATT, M. F.; KABESCH, M.; LIANG, L.; DIXON, A. L.; STRACHAN, D.; HEATH, S.; DEPNER, M.; VON BERG, A.; BUFE, A.; RIETSCHEL, E.; HEINZMANN, A.; SIMMA, B.; FRISCHER, T.; WILLIS-OWEN, S. A. G.; WONG, K. C. C.; ILLIG, T.; VOGELBERG, C.; WEILAND, S. K.; VON MUTIUS, E.; ABECASIS, G. R.; FARRALL, M.; GUT, I. G.; LATHROP, G. M.; COOKSON, W. O. C. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. **Nature**. v. 448, p. 470-474, 2007.

MOSSEY, P.; CASTILLIA, E. **Global registry and database on craniofacial anomalies...**2003. Relatório da Reunião da Organização Mundial de Saúde em Anomalias Craniofaciais, Geneva, 2003.

MOSSEY, P.; LITTLE, J.; MUNGER, R.; DIXON, M.; SHAW, W. Cleft lip and palate. **The Lancet**. v. 374, p. 1-13, 2009.

MOSTOWSKA, A.; HOZYASZ, K.; WOJCICKI, P.; BIEDZIAK, B.; PARADOWSKA, P.; JAGODZINSKI, P. Association between Genetic Variants of Reported Candidate Genes or Regions and Risk of Cleft Lip with or without Cleft Palate in the Polish Population. **Birth Defects Research (Part A)**. v. 88, p. 538-545, 2010.

NICA, A. C.; MONTGOMERY, S. B.; DIMAS, A. S.; STRANGER, B. E.; BEAZLEY, C.; BARROSO, I.; DERMITZAKIS, E. T. Candidate Causal Regulatory Effects by Integration of Expression QTLs with Complex Trait Genetic Associations. **PLoS Genet**. v. 6, n. 4, 2010.

NICA, A. C.; PARTS, L.; GLASS, D.; NISBET, J.; BARRETT, A.; SEKOWSKA, M.; TRAVERS, M.; POTTER, S.; GRUNDBERG, E.; SMALL, K.; HEDMAN, A. K.; BATAILLE, V.; TZENOVA, B. J.; SURDULESCU, G.; DIMAS, A. S.; INGLE, C.; NESTLE, F. O.; DI MEGLIO, P.; MIN, J.

L.; WILK, A.; HAMMOND, C. J.; HASSANALI, N.; YANG, T. P.; MONTGOMERY, S. B.; O'RAHILLY, S.; LINDGREN, C. M.; ZONDERVAN, K. T.; SORANZO, N.; BARROSO, I.; DURBIN, R.; AHMADI, K.; DELOUKAS, P.; MCCARTHY, M. I.; DERMITZAKIS, E. T.; SPECTOR, T. D.; MUTHER CONSORTIUM. The architecture of gene regulatory variation across multiple human tissues: the MuTHER study. **PLoS Genet.** v. 7, n. 2, 2011.

NICOLAE, D. L.; GAMAZON, E.; ZHANG, W.; DUAN, S.; DOLAN, M. E. COX, N. J. Trait-Associated SNPs Are More Likely to Be eQTLs: Annotation to Enhance Discovery from GWAS. **PLoS Genet.** v. 6, n. 4, 2010.

NIKOPENSIUS, T.; AMBROZAITYTE, L.; LUDWIG, K. U.; BIRNBAUM, S.; JAGOMAGI, T.; SAAG, M.; MATULEVICIENE, A.; LINKEVICIENE, L.; HERMS, S.; KNAPP, M.; HOFFMANN, P.; NOTHEN, M. M.; KUCINSKAS, V.; METSPALU, A.; MANGOLD, E. Replication of novel susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24 in Estonian and Lithuanian patients. **Am J Med Genet A.** v. 149A, p. 2551–2553, 2009.

PASSOS-BUENO, M. R.; ALONSO, N.; BRITO, L. A. Fissura labiopalatina: genética, reabilitação e aconselhamento genético. In: KIM, C. A; ALBANO, L. M. J; BERTOLA, D. R. (Org.). **Genética na Prática Pediátrica.** 1 ed. Barueri: Manole, 2010, v. 1, p. 159-173.

PAN, Y.; MA, J.; ZHANG, W.; DU, Y.; NIU, Y.; WANG, M.; ZHANG, Z.; WANG, L. IRF6 polymorphisms are associated with nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population. **Am J Med Genet.** v. 152A, p. 2505–2511, 2010.

PARK, J.; MCINTOSH, I.; HETMANSKI, J.; JABS, E.; KOLK, C.; WU-CHOU, Y.; CHEN, P.; CHONG, S.; YEOW, V.; JEE, S.; PARK, B.; FALLIN, D.; INGERSOLL, R.; SCOTT, A.; BEATY, T. Association between IRF6 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in four populations. **Genet Med.** v. 9, p. 219–227, 2007.

PEGELOW, M.; PEYRARD-JANVID, M.; ZUCHELLI, M.; FRANSSON, I.; LARSON, O.; KERE, J.; LARSSON, C.; KARSTEN, A. Familial non-syndromic cleft lip and palate-analysis of the *IRF6* gene and clinical phenotypes. **European Journal of Orthodontics.** v. 30, p. 169–175, 2008.

RAHIMOV, F.; MARAZITA, M.; VISEL, A.; COOPER, M.; HITCHLER, M.; RUBINI, M.; DOMANN, F.; GOVIL, M.; CHRISTENSEN, K.; BILLE, C.; MELBYE, M.; JUGESSUR, A.; LIE, R.; WILCOX, A.; FITZPATRICK, D.; GREEN, E.; MOSSEY, P.; LITTLE, J.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.; PENNACCHIO, L.; SCHUTTE, B.; MURRAY, J. Disruption of an AP-2a

binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. **Nature Genetics**. v. 40, p. 1341-1347, 2008.

RICHARDS, A. L.; JONES, L.; MOSKVINA, V.; KIROV, G.; GEJMAN, P. V.; LEVINSON, D. F.; SANDERS, A. R.; MOLECULAR GENETICS OF SCHIZOPHRENIA COLLABORATION (MGS), INTERNATIONAL SCHIZOPHRENIA CONSORTIUM (ISC), PURCELL, S.; VISSCHER, P. M.; CRADDOCK, N.; OWEN, M. J.; HOLMANS, P.; O'DONOVAN, M. C. Schizophrenia susceptibility alleles are enriched for alleles that affect gene expression in adult human brain. **Molecular Psychiatry**. v. 17, p. 193-201, 2012.

ROMITTI, P. A.; LIDRAL, A. C.; MUNGER, R. G.; DAACK-HIRSCH, S.; BURNS, T. L.; MURRAY, J. C. Candidate Genes For Nonsyndromic Cleft Lip and Palate and Maternal Cigarette Smoking and Alcohol Consumption: Evaluation of Genotype-Environment Interactions from a Population-Based Case-Control Study of Orofacial Clefts. **TERATOLOGY**. v. 59, p. 39-50, 1999.

SATOKATA, I.; MAAS, R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. **Nature Genetics**. v. 6, n. 4, p. 348–356, 1994.

SCAPOLI, L.; PALMIERI, A.; MARTINELLI, M.; PEZZETTI, F.; CARINCI, P.; TOGNON, M.; CARINCI, F. Strong Evidence of Linkage Disequilibrium between Polymorphisms at the IRF6 Locus and Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate, in an Italian Population. **Am. J. Hum. Genet.** v. 76, p. 180–183, 2005.

SCHADT, E. E.; MONKS, S. A.; DRAKE, T. A.; LUSISK, A. J.; CHEK, N.; COLINAYOK, V.; RUFF, T. G.; MILLIGAN, S. B.; LAMB, J. R.; CAVET, G.; LINSLEY, P. S.; MAO, M.; STOUGHTON, R. B.; FRIEND, S. H. Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. **NATURE**. v. 422, 2003.

SCHADT, E.; MOLONY, C.; CHUDIN, E.; HAO, K.; YANG, X.; LUM, P.; KASARSKIS, A.; ZHANG, B.; WANG, S.; SUVER, C.; ZHU, J.; MILLSTEIN, J.; SIEBERTS, S.; LAMB, J.; THAKURTA, D.; DERRY, J.; STOREY, J.; AVILA-CAMPILLO, I.; KRUGER, M.; JOHNSON, J.; ROHL, C.; VAN NAS, A.; MEHRABIAN, M.; DRAKE, T.; LUSIS, A.; SMITH, R.; GUENGERICH, F.; STROM, S.; SCHUETZ, E.; RUSHMORE, T.; ULRICH, R. Mapping the Genetic Architecture of Gene Expression in Human Liver. **PLoS Biology**. v. 6, p. 1020-1032, 2008.

SHAW, G. M.; IOVANNISCI, D. M.; YANG, W.; FINNELL, R. H.; CARMICHAEL, S. L.; CHENG, S.; LAMMER, E. J. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) genetic variants, maternal smoking, vitamin use, and risk of human orofacial clefts. **Am J Epidemiol**. v. 162, n. 12, p. 1207-14, 2005.

SHAW, G. M.; CARMICHAEL, S. L.; LAURENT, C.; RASMUSSEN, S. A. Maternal nutrient intakes and risk of orofacial clefts. **Epidemiology**. v. 17, p. 285–91, 2006.

SHI M, CHRISTENSEN K, WEINBERG CR, ROMITTI P, BATHUM L, LOZADA A, MORRIS RW, LOVETT M, MURRAY JC. **Am J Hum Genet**. Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. v. 80, n. 1, p. 76-90, 2007.

SOTELO, J.; ESPOSITO, D.; DUHAGON, M.A. ; BANFIELD, K.; MEHALKO, J.; LIAO, H.; STEPHENS, R. M.; HARRIS, T. J. R.; MUNROE, D. J.; WU, X. Long-range enhancers on 8q24 regulate c-Myc. **PNAS**. v. 107, n. 7, p. 3001–3005, 2010.

SPINA, V.; PSILLAKIS, J. M.; LAPA, F. S.; FERREIRA, M. C. Classificação das Fissuras lábio-palatinas. Sugestão de modificação. **Rev. Hosp. Clin Fac Med S. Paulo**. v. 27, p. 5-6, 1972.

STAHL, E. A.; RAYCHAUDHURI, S.; REMMERS, E. F.; XIE, G.; EYRE, S.; THOMSON, B. P.; LI, Y.; KURREEMAN, F. A. S.; ZHERNAKOVA, A.; HINKS, A.; GUIDUCCI, C.; CHEN, R.; ALFREDSSON, L.; AMOS, C. I.; ARDLIE, K. G.; BIRAC CONSORTIUM; BARTON, A.; BOWES, J.; BROUWER, E.; BURTT, N. P.; CATANESE, J. J.; COBLYN, J.; COENEN, M. J.; COSTENBADER, K. H.; CRISWELL, L. A.; CRUSIUS, J. B.; CUI, J.; DE BAKKER, P. I.; DE JAGER, P. L.; DING, B.; EMERY, P.; FLYNN, E.; HARRISON, P.; HOCKING, L. J.; HUIZINGA, T. W.; KASTNER, D. L.; KE, X.; LEE, A. T.; LIU, X.; MARTIN, P.; MORGAN, A. W.; PADYUKOV, L.; POSTHUMUS, M. D.; RADSTAKE, T. R.; REID, D. M.; SEIELSTAD, M.; SELDIN, M. F.; SHADICK, N. A.; STEER, S.; TAK, P. P.; THOMSON, W.; VAN DER HELM-VAN MIL, A. H.; VAN DER HORST-BRUINSMA, I. E.; VAN DER SCHOOT, C. E.; VAN RIEL, P. L.; WEINBLATT, M. E.; WILSON, A. G.; WOLBINK, G. J.; WORDSWORTH, B. P.; YEAR CONSORTIUM; WIJMENGA, C.; KARLSON, E. W.; TOES, R. E.; DE VRIES, N.; BEGOVICH, A. B.; WORTHINGTON, J.; SIMINOVITCH, K. A.; GREGERSEN, P. K.; KLARESKOG, L.; PLENGE, R. M. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. **Nat. Genet**. v. 42, n. 6, p. 508–514, 2010.

STRACHAN, T.; READ, A. P. Complex diseases: theory and results. In: \_\_\_\_\_. **Human Molecular Genetics**. New York: Wiley-Liss, 1999. Cap. 19, p. 451.

STRANGER, B. E.; DERMITZAKIS, E. T. The genetics of regulatory variation in the human genome. **Human Genomics**. v 2, n. 2, p. 126–131, 2005.



TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. v. 131, n. 5, p. 861-72, 2007.

TOLAROVA, M.; VAN ROOIJ, I.; PASTOR, M. A common mutation in the MTHFR gene is a risk factor for nonsyndromic cleft lip and palate anomalies. **The American Journal of Human Genetics**. v. 63, p. 27, 1998.

VAN ROOIJ, I. A.; WEGERIF, M. J.; ROELOFS, H. M.; PETERS, W. H.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; ZIELHUIS, G. A.; MERKUS, H. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. Smoking, genetic polymorphisms in biotransformation enzymes, and nonsyndromic oral clefting: a gene-environment interaction. **Epidemiology**. v. 12, n. 5, p. 502-7, 2001.

VAN ROOIJ, I.A.; OCKE, M. C.; STRAATMAN, H.; ZIELHUIS, G. A.; MERKUS, H. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. **Prev Med**.v. 39, p. 689–94, 2004.

VANDERAS, A. P. Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. **Cleft Palate J**. v. 24, n. 3, p.216-25, 1987.

VIEIRA, A.; MCHENRY, T.; DAACK-HIRSCH, S.; MURRAY, J.; MARAZITA, M.A Genome Wide Linkage Scan for Cleft Lip and Palate and Dental Anomalies. **American Journal of Medical Genetics**. v. 146, n. 11, p. 1406–1413, 2008.

WASSERMAN, N. F.; ANEAS, I.; NOBREGA, M. A. An 8q24 gene desert variant associated with prostate cancer risk confers differential in vivo activity to a MYC enhancer. **Genome Res**. v. 20, n. 9, p. 1191-7, 2010.

WEINBERG, S. M.; BRANDON, C. A.; MCHENRY, T. H.; NEISWANGER, K.; DELEYIANNIS, F. W. B.; DE SALAMANCA, J. E.; CASTILLA, E. E.; CZEIZEL, A. E.; VIEIRA, A. R.; MARAZITA, M. L. Rethinking Isolated Cleft Palate: Evidence of Occult Lip Defects in a Subset of Cases. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v. 146A, p. 1670–1675, 2008.

WILCOX, A. J.; LIE, R. T.; SOLVOLL, K.; TAYLOR, J.; MCCONNAUGHEY, D. R.; ABYHOLM, F.; VINDENES, H.; VOLLSET, S. E.; DREVON, C. A. Folic acid supplements and risk of

facial clefts: national population based case-control study. **Br Med J.** v. 334, p. 464-70, 2007.

WONG, F.; HÄGG, U. An update on the aetiology of orofacial clefts. **Hong Kong Med J.** v. 10, n. 5, p. 331-336, 2004.

ZUCCHERO, T.; COOPER, M.; MAHER, B.; DAACK-HIRSCH, S.; NEPOMUCENO, B.; RIBEIRO, L.; CAPRAU, D.; CHRISTENSEN, K.; SUZUKI, Y.; MACHIDA, J.; NATSUME, N.; YOSHIURA, K.; VIEIRA, A.; ORIOLI, I.; CASTILLA, E.; MORENO, L.; ARCOS-BURGOS, M.; LIDRAL, A.; FIELD, L.; LIU, Y.; RAY, A.; GOLDSTEIN, T.; SCHULTZ, R.; SHI, M.; JOHNSON, M.; KONDO, S.; SCHUTTE, B.; MARAZITA, M.; MURRAY, J. Interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. **The New England Journal of Medicine.** v. 351, p. 769-780, 2004.