

Luciano Abreu Brito

Identificação de Genes de Suscetibilidade às Fissuras  
Labiopalatinas Não Síndrômicas: Influência da  
Epidemiologia e da Estratificação Populacional

Identification of Susceptibility Genes to Nonsyndromic Cleft Lip /  
Palate: epidemiology and population stratification influences

São Paulo

2011

Luciano Abreu Brito

Identificação de Genes de Suscetibilidade às Fissuras  
Labiopalatinas Não Síndrômicas: Influência da  
Epidemiologia e da Estratificação Populacional

Identification of Susceptibility Genes to Nonsyndromic Cleft Lip /  
Palate: epidemiology and population stratification influences

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

Orientadora: Maria Rita Passos-Bueno

São Paulo

2011

# Ficha Catalográfica

---

Brito, Luciano A.

Identificação de Genes de  
Suscetibilidade às Fissuras Labiopalatinas Não  
Sindrômicas: Influência da Epidemiologia e da  
Estratificação Populacional

79 páginas

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

1.Fissura labiopalatina 2.Estudo de associação  
3.Ancestralidade genômica

Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr.(a). Maria Rita Passos Bueno

Orientadora

A todas as famílias portadoras  
de fissuras labiopalatinas  
atendidas durante  
este projeto

# Agradecimentos

---

À minha orientadora, Maria Rita Passos Bueno, pela oportunidade de desenvolver um trabalho no laboratório e por toda a orientação dispensada desde o meu ingresso no laboratório.

À minha família, em especial meus pais meu irmão e meu cachorro, com quem convivo diariamente e de quem sempre recebi todo o apoio necessário.

Aos amigos do laboratório, que muitas vezes transformam o ambiente de trabalho em um agradável circo, na real acepção da palavra. Agradeço em especial a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para este projeto, incluindo aqui as intermináveis jornadas de extração de DNA: Camila, Lucas, Lígia, Gerson, Melina, Carol, Dani Yumi, Dani Bueno, Cibele, Eric, Joel, Lara, Letícia, Bruno, May, Vanessa, Joanna, Felipe, Dani Moreira, Atique, Cíntia, Érika, Karina, Deinha, Roberto, Larissa, Simone e Meire.

Aos funcionários do Genoma, em especial ao pessoal do sequenciamento, Martha e Camila, que aturaram milhares de placas de genotipagem, algumas delas formatadas corretamente, e Kátia, excelente coorientadora durante todo este projeto.

A todos os pacientes atendidos, solícitos em contribuir com a pesquisa.

E à equipe da Operação Sorriso, pela oportunidade de participar dos programas de reabilitação, que me proporcionaram uma experiência única de contato com os pacientes.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da FAPESP, do CNPq e do Ministério da Ciência e Tecnologia do Brasil.

---

## Notas

---

Esta dissertação de mestrado compreende um trabalho desenvolvido durante os anos de 2009 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).

As referências citadas nos artigos (capítulos 3 e 4) encontram-se ao final de cada um, no formato da revista *American Journal of Medical Genetics*, na qual um dos artigos foi aceito para publicação. As referências bibliográficas dos capítulos 1, 2 e 5 (Introdução, Metodologia Geral e Discussão Geral / Conclusões, respectivamente) estão relacionadas ao final da dissertação.

Ambos os artigos estão redigidos em inglês, por motivos referentes à publicação.

Para suprir informações omitidas nas metodologias dos artigos, optei por criar uma breve seção de Metodologia Geral.

## Lista de Abreviações

---

**AIM:** marcador informativo de ancestralidade

**CI:** intervalo de confiança (*confidence interval*)

**FL:** fissura de lábio somente

**FL+P:** fissura de lábio com fissura de palato

**FL±P:** fissuras labial com ou sem fissura no palato

**FP:** fissura de palato somente

**H<sup>2</sup>:** herdabilidade

**Indel:** polimorfismo de inserção-deleção

**IRF6:** *Interferon Regulatory Factor 6*

**NS:** não sindrômico (a)

**QTL:** *quantitative trait locus*

**SNP:** *single nucleotide polymorphism*

**SVW:** síndrome de van der Woude

**TDI:** teste de desequilíbrio de transmissão

---

# Índice

---

<b>Capítulo 1.</b>	<b>Introdução Geral</b>	<b>1</b>
1.1.	Aspectos Gerais das Fissuras Labiopalatinas	1
1.1.1.	<i>Clínica</i>	1
1.1.2.	<i>Epidemiologia</i>	3
1.1.3.	<i>Embriologia</i>	4
1.1.4.	<i>Genéticas das Fissuras Não Síndrômicas</i>	6
1.1.5.	<i>Fatores Ambientais</i>	10
1.1.6.	<i>Reabilitação</i>	11
1.2.	Estratégias de Identificação de Genes Associados às Fissuras	12
1.2.1.	<i>Estudos de Ligação</i>	12
1.2.2.	<i>Estudos de Associação e as Dificuldades Geradas pela Estratificação Populacional</i>	13
1.2.3.	<i>Estudos de Expressão Gênica</i>	14
1.3.	O uso de Marcadores de Ancestralidade na Caracterização de Populações	14
1.4.	Objetivos	16
<b>Capítulo 2.</b>	<b>Metodologia Geral</b>	<b>18</b>
2.1.	Atendimento aos Pacientes	18
2.2.	Coleta de Material Biológico e Extração de DNA	19
<b>Capítulo 3.</b>	<b>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</b>	<b>20</b>
<b>Capítulo 4.</b>	<b><i>IRF6</i> and 8q24 Roles in Susceptibility to Nonsyndromic Cleft Lip/Palate in Brazilian Population</b>	<b>29</b>
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Discussão Geral e Conclusões</b>	<b>54</b>
<b>Resumo</b>		<b>59</b>
<b>Abstract</b>		<b>61</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>		<b>63</b>

---



## Capítulo 1. Introdução Geral

---

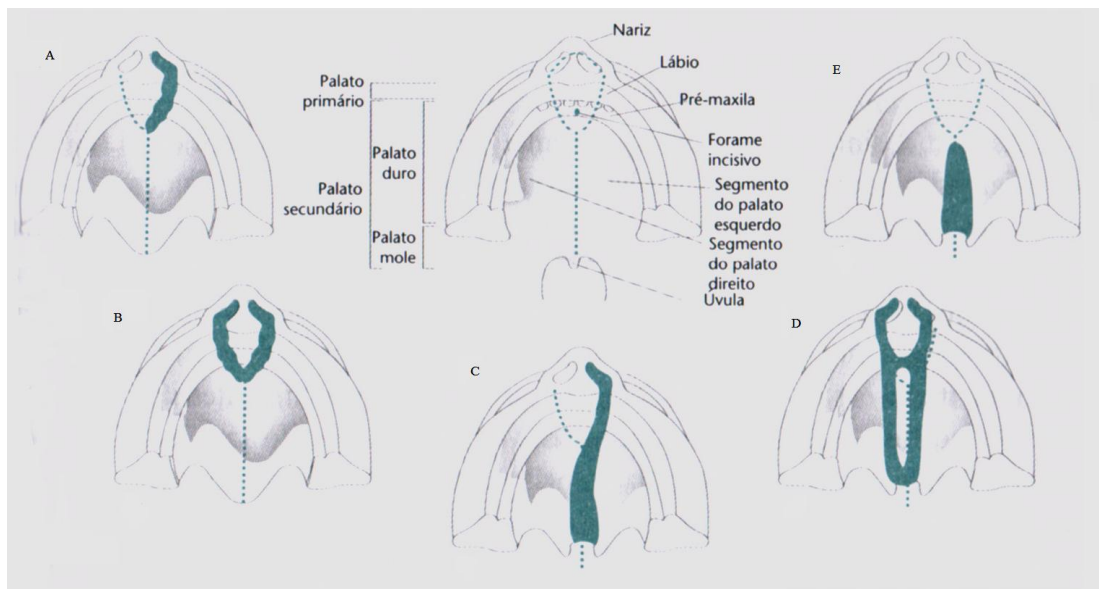
### 1.1 Aspectos Gerais das Fissuras labiopalatinas

#### 1.1.1 Clínica

As fissuras labiopalatinas caracterizam-se essencialmente pela separação incompleta das cavidades oral e nasal, admitindo um grande espectro de variabilidade clínica. O acometimento do lábio pode ser unilateral ou bilateral, com a fissura atingindo a(s) narina(s) ou não. O palato pode ser acometido por fissura pré-forame incisivo anterior e pós-forame; quando a fissura atinge as duas estruturas, a fissura é dita transforame. Também podem ser classificadas como uni ou bilaterais (Figs. 1 e 2; Schutte e Murray, 1999; Gorlin *et al.*, 2001).



**Figura 1 – Variabilidade clínica das fissuras labiopalatinas, em crianças atendidas durante a realização do projeto. A) Fissura labial unilateral direita; B) Fissura labial bilateral; C) Fissura de palato; D) Detalhe de fissura de palato submucosa com úvula bífida.**



**Figura 2 – Esquema da variabilidade clínica das fissuras palatinas. A) Fissura pré-forame unilateral. B) Fissura pré-forame bilateral; C) Fissura transforame unilateral; D) Fissura transforame bilateral; E) Fissura pós-forame. No centro, divisões do palato (duro / mole e primário / secundário, esta última classificação derivada da formação embriológica) e posições das estruturas (Kim et al., 2010).**

Além das características clinicamente mais óbvias de serem notadas, as fissuras labiopalatinas podem carregar consigo microformas mais brandas, de difícil percepção, como, por exemplo, a descontinuidade do músculo orbicular do lábio (Rogers *et al.*, 2008; Weinberg *et al.*, 2008; Jugessur *et al.*, 2009), a fissura de palato submucosa (união imperfeita do músculo no véu palatino, mas com superfície da mucosa intacta; Gorlin *et al.*, 2001), e úvula bífida (Fig. 1).

A forma mais usual de classificação das fissuras labiopalatinas entre os geneticistas é o agrupamento em formas sindrômicas, quando outras anomalias estão presentes além da fissura, ou não sindrômicas (NS), quando estas ocorrem isoladamente.

### 1.1.2 Epidemiologia

As fissuras labiopalatinas são as malformações faciais mais comuns ao nascimento, de incidência frequentemente citada como 1:700 (Stanier e Moore, 2004), apresentando grande variação entre etnias, origens geográficas e níveis socioeconômicos. Em populações europeias, a incidência é, em média, 1:1.000 nascimentos (varia de 0,7 a 1,3). A incidência é considerada maior em nativos americanos (3,6:1.000), japoneses (2,1:1.000) e chineses (1,4:1.000); populações africanas, por outro lado, apresentam a menor incidência (0,3:1.000; Vanderas, 1987; Tolarova e Cervenka, 1998; Gorlin *et al.*, 2001). No Brasil, a incidência já foi estimada entre 0,28 a 1,54:1.000 (Nagem Filho e Martins, 1968; Menegotto e Salzano, 1991b;.Loffredo *et al.*, 2001).

As formas sindrômicas de fissura respondem por, aproximadamente, 30% do total de casos. Existem descritas mais de 400 síndromes, de diferentes etiologias (*Online Mendelian Inheritance in Men*, OMIM). Podem estar relacionadas a este grupo alterações gênicas, cromossômicas ou ainda fatores teratogênicos em exposição no primeiro trimestre do desenvolvimento embrionário (Gorlin *et al.*, 2001), descritos na seção 1.4.

Dentre as formas sindrômicas, a mais comum é a síndrome de van der Woude (SVW), respondendo por 2% dos casos totais de fissura (e incidência de 1:35.000). É uma condição de herança autossômica dominante, com penetrância de 92%, que se caracteriza pela presença de comissuras no lábio inferior (que são glândulas salivares ectópicas, também chamadas de *pits* ou fossetas labiais), hipodontia, além da fissura, que pode envolver lábio, palato ou ambos. É a presença dos *pits* que permite, na

maioria dos casos, distinguir clinicamente a SVW das fissuras não sindrômicas (Van Der Woude, 1954; Gorlin *et al.*, 2001).

A fissura não sindrômica é uma doença complexa com herança do tipo multifatorial (a ocorrência envolve componentes genéticos e ambientais) e somam 70% dos casos totais de fissura (Schutte e Murray, 1999). São historicamente divididas em fissura de palato isolada (FP) e fissura labial com ou sem fissura de palato (FL±P), devido a uma provável diferença etiológica entre elas. Entre as evidências epidemiológicas sustentando essa separação, estão as diferentes incidências e riscos de recorrência observados em cada grupo (Tabela I).

**Tabela I - Diferenças de incidência média entre fissuras labiais com ou sem fissura de palato (FL±P) e fissura de palato isolada (FP) e riscos de recorrência aproximados para futuros irmãos de uma criança afetada (Gorlin *et al.*, 2001).**

	<b>FL±P</b>	<b>FP</b>
Incidência por etnia	1:2400 africanos 1:1000 caucasianos 1:500 asiáticos e nativos americanos	1:2000, sem heterogeneidade étnica
Incidência por sexo	60-80% homens	Predominância em mulheres
Risco de recorrência	3-4%	2%

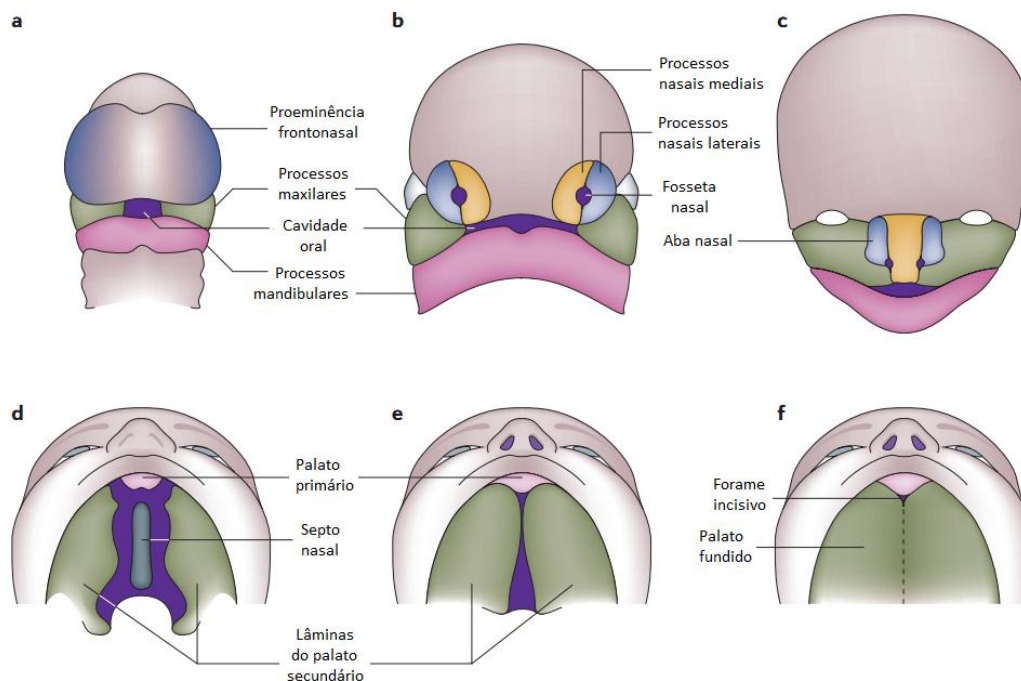
### 1.1.3 Embriologia

O início da formação do lábio se dá na quarta semana de gestação, quando os primórdios faciais são originados a partir migração de células da crista neural e de

células mesodérmicas. Nesta etapa, podem ser distinguidas cinco proeminências (frontonasal, duas mandibulares e duas maxilares; Fig. 3). A partir da quarta semana de desenvolvimento, forma-se a proeminência nasal medial a partir do crescimento da proeminência frontonasal. O lábio superior e o palato primário são então formados quando as proeminências maxilares encontram a proeminência nasal, processo que ocorre até a sétima semana (Jiang *et al.*, 2006).

A formação do palato secundário inicia-se na sexta semana, a partir do crescimento das lâminas palatinas, estruturas derivadas das proeminências maxilares e localizadas lateralmente à língua em desenvolvimento. Em seguida, as lâminas palatinas crescem horizontalmente e, após entrarem em contato uma com a outra, segue a fusão completa até o final da 12<sup>a</sup> semana (Fig. 3; Kerrigan *et al.*, 2000).

A fissura, portanto, pode ser decorrente de qualquer distúrbio nos mecanismos biológicos que regulam estes processos durante esta etapa da embriogênese, sejam eles de natureza intrínseca (genéticos) ou extrínseca (ambientais)



**Figura 3 - Esquema da formação do lábio e palato. a) Proeminência frontonasal, processos maxilares e processos mandibulares circundando a cavidade oral na 4ª semana do desenvolvimento embrionário. b) Por volta da 5ª semana, a fosseta nasal é formada, além dos processos nasais laterais e mediais. c) Processos nasais mediais fundem-se com os maxilares para a formação do lábio superior e palato primário no fim da 6ª semana. Os processos nasais laterais formam as abas nasais, e os mandibulares formam a mandíbula. d) Na 6ª semana, o palato secundário se desenvolve a partir dos processos maxilares, que crescem verticalmente. e) As lâminas palatinas elevam-se para uma posição horizontal acima da língua e encostam uma na outra, iniciando a fusão. f) A fusão completa das lâminas palatinas divide completamente as cavidades oral e nasal. Figura modificada de Dixon *et al.*, (2011).**

#### 1.1.4 Genética das Fissuras Não Sindrômicas

Dentre as evidências frequentemente observadas em favor de um importante componente genético para essas formas em diferentes estudos, está a agregação familiar (observada em 20-30% dos casos; Lie *et al.*, 1994; Carinci *et al.*, 2007), e a concordância em gêmeos (monozigóticos: 40-60%; dizigóticos: 3-5%; Christensen e Fogh-Andersen, 1993).

Estudos de herdabilidade (proporção da variância total da doença que é devida à variância genética) das FL±Ps NS também evidenciam a participação da genética nessas malformações e revelam diferentes contribuições genéticas para a malformação entre as populações. Estes estudos têm observado uma variação de herdabilidade de 17% a 84%, utilizando diferentes metodologias (Tabela II).

Ao contrário da maioria dos genes das formas sindrômicas, a associação de genes com FL±Ps NS permanece bastante controversa. Muitos estudos têm se dedicado a encontrá-los, incluindo estudos de ligação ou associação, de gene candidato ou varredura genômica, além de estudos de expressão gênica em células humanas ou em modelos animais (ver seção 1.2).

Os esforços para a descoberta de variantes de suscetibilidade às FL±Ps NS foram primeiramente baseados em estudos de associação com genes candidatos ou em estudos de ligação com famílias. Entretanto, muitas das associações encontradas nesses estudos iniciais eram de difícil replicação, dada a heterogeneidade dos fatores genéticos envolvidos e também à penetrância deles, presumidamente menor do que a dos genes responsáveis pelas formas sindrômicas de padrão mendeliano de herança. O estudo molecular destas, aliás, foi de grande valor para a elucidação dos genes responsáveis pelas fissuras não sindrômicas (Carinci et al., 2007). Recentemente, resultados mais consistentes têm sido produzidos por estudos de associação e ligação de varredura genômica com grande densidade de marcadores (Tabela III).

**Tabela II - Estimativas de herdabilidade ( $H^2$ ) realizadas em diferentes países, baseadas em estudos de gêmeos ou parentes em primeiro, segundo e terceiro grau**

Local	Desenho do estudo	$H^2$	Referência
Finlândia	Gêmeos	17%	Nordstrom <i>et al.</i> , 1996
Dinamarca	Gêmeos	45%	Nordstrom <i>et al.</i> , 1996
Taiwan	Gêmeos	53%	Lin <i>et al.</i> , 1999
América do Sul	Parentes em 1º grau	74%	Menegotto e Salzano, 1991a
China	Parentes em 1º a 3º grau	77.6%	Hu <i>et al.</i> , 1982
França	Parentes em 1º grau	81%	Stoll <i>et al.</i> , 1991
Itália	Parentes em 1º a 3º grau	82%	Tenconi <i>et al.</i> , 1988
Itália	Parentes em 1º grau	84%	Calzolari <i>et al.</i> , 1988



**Tabela III - Loci recentemente associados com FL±Ps NS em estudos de varredura genômica, genes candidatos e suas funções.**

<b>Região</b>	<b>Gene candidato</b>	<b>Produto</b>	<b>Referência</b>
1q32-q41	<i>IRF6</i>	Fator de transcrição	Zucchero <i>et al.</i> , 2004; Beaty <i>et al.</i> , 2010
8q24	Não há		Birnbaum <i>et al.</i> , 2009; Chiquet <i>et al.</i> , 2009; Grant <i>et al.</i> , 2009; Beaty <i>et al.</i> , 2010
10q25.3	<i>VAX1</i>	Fator de transcrição	Mangold <i>et al.</i> , 2009; Beaty <i>et al.</i> , 2010
6q14.2	<i>PRSS35</i>	Peptidase	Marazita <i>et al.</i> , 2002; Letra <i>et al.</i> , 2010
9q22	<i>FOXE1</i>	Fator de transcrição	Moreno <i>et al.</i> , 2009
1q22.1	<i>ABCA4</i>	Transportador transmembrana	Beaty <i>et al.</i> , 2010
20q12	<i>MAFB</i>	Fator de transcrição	Beaty <i>et al.</i> , 2010
4p16	<i>MSX1</i> <i>STK32B</i> <i>EVC</i> <i>EVC2</i>	Fator de transcrição Cinase Transdução de sinal Transdução de sinal	Van Den Boogaard <i>et al.</i> , 2000; Ingersoll <i>et al.</i> , 2010
1q36	<i>PAX7</i>	Fator de transcrição	Beaty <i>et al.</i> , 2010

Dentre os *loci* que surgiram dessas análises, marcadores no gene *IRF6* e em um deserto gênico em 8q24 são os mais corroborados em diferentes populações.

O gene *IRF6* pertence a uma família de nove fatores de transcrição que compartilham um domínio hélice-volta-hélice ligante do DNA altamente conservado e um domínio menos conservado ligante à proteína. Apesar da maioria dos IRFs desempenhar um papel conhecido na regulação da expressão dos interferons alfa e beta na resposta a infecções virais, o papel do *IRF6*, em particular, permanece desconhecido. Além da SVW, causada por mutações nesse gene, há indícios cada vez mais consistentes de que variantes mais comuns nesse gene estejam envolvidas com a predisposição às FL±Ps NS (Kondo *et al.*, 2002; Zuccherro *et al.*, 2004; Carinci *et al.*, 2007).

### **1.1.5. Fatores Ambientais**

Muitos fatores ambientais têm sido associados à ocorrência das fissuras, tais como anticonvulsivantes, corticosteroides, benzodiazepinas, antagonistas do ácido fólico, talidomida, exposição a pesticidas e solventes orgânicos, ingestão em excesso de vitamina A, diabetes mellitus, diabetes gestacional, estresse, obesidade, consumo de álcool e tabagismo, entre outros (Wyszynski e Beaty, 1996; Schutte e Murray, 1999; Bender, 2000; Hernandez-Diaz *et al.*, 2000; Pradat *et al.*, 2003; Jugessur e Murray, 2005; Chevrier *et al.*, 2006; Krapels *et al.*, 2006; Deroo *et al.*, 2008; Dolk *et al.*, 2008). O ácido fólico, por outro lado, parece atuar na prevenção da ocorrência das FL/Ps (Wilcox *et al.*, 2007). Os resultados dos estudos dos fatores ambientais, entretanto, são bastante conflitantes.

### 1.1.6. Reabilitação

A grande maioria dos pacientes com fissura labiopalatina apresenta desenvolvimento cognitivo normal; contudo, a reabilitação bem sucedida representa um custo elevado para a sociedade e consiste em um processo bastante penoso para o afetado e seus familiares, uma vez que o tratamento envolve vários procedimentos cirúrgicos e intervenção de uma equipe multidisciplinar, podendo incluir médicos, geneticistas, fonoaudiólogos, dentistas, nutricionistas e psicólogos, entre outras especialidades. Como frequentemente os indivíduos afetados também são vítimas de certo isolamento social, a reabilitação é considerada completa quando a total reinserção do afetado na sociedade é alcançada.

Este acompanhamento multidisciplinar frequentemente dura até a idade adulta e tem custos estimados em mais de US\$ 100,000 por paciente (*Centers for Disease and Prevention* [CDC], 1995, 2007), colocando esse grupo de malformações como um relevante problema de saúde pública. Com o intuito de contribuir para a prevenção e reabilitação dos indivíduos acometidos pelas fissuras, existe um grande esforço na tentativa de identificar os fatores de predisposição, tanto genéticos quanto ambientais, a estas malformações.

## 1.2. Estratégias de Identificação de Genes Associados às Fissuras

### 1.2.1. Estudos de Ligação

Estudos de ligação são abordagens de mapeamento genético baseadas na observação da segregação de marcadores genéticos de localizações cromossômicas conhecidas com a doença em várias meioses em indivíduos de uma ou mais famílias. Esta abordagem parte do princípio de que dois *loci* próximos estão ligados e que tendem a ser transmitidos juntos nas meioses. Assim sendo, quando for identificado um marcador que segregue junto com a doença em estudo, sugere-se que o *locus* da doença esteja localizado próximo deste marcador (Altschuler *et al.*, 2008). Genes de grande efeito, geralmente associados a síndromes mendelianas, são mais propícios a serem identificados com essa abordagem, para a qual um dos requisitos é justamente a presença de famílias grandes segregando a doença. De fato, muitos genes mendelianos responsáveis por fissuras sindrômicas foram identificados dessa maneira, como o *IRF6*, responsável pela SVW (Kondo *et al.*, 2002), e o *COL2A1*, responsável pela síndrome de Stickler tipo II (Francomano *et al.*, 1987), forma sindrômica de fissura de palato, miopia e perda de audição de herança autossômica dominante.

Entretanto, as fissuras não sindrômicas, assim como a maioria das doenças comuns, parecem não ser causadas por variantes de grande efeito. Dado o padrão de herança multifatorial, a ocorrência de muitos indivíduos afetados em uma família também é menos frequente. Essas características, portanto, acabam dificultando a abordagem de ligação na busca dos genes associados a fissuras não sindrômicas.

Apesar dessas limitações, muitos estudos de ligação já foram realizados em fissura não síndrômica, mas os resultados em geral não são bem replicados.

### **1.2.2. Estudos de Associação e as Dificuldades Geradas pela Estratificação Populacional**

A abordagem geralmente mais utilizada para doenças complexas é o estudo de caso-controle, no qual se procura verificar se a frequência de variantes polimórficas difere entre o grupo de pacientes e controles. Muitos estudos de caso-controle têm sido realizados para encontrar fatores de suscetibilidade às fissuras não síndrômicas, seja investigando um gene candidato, ou região candidata, ou o genoma inteiro através de densos painéis de marcadores genéticos. Algumas variantes encontradas por essa abordagem foram descritas na tabela III.

O maior problema dessa abordagem, entretanto, é a estratificação populacional decorrente da mistura étnica, ou seja, a presença de subgrupos relativamente distintos dentro da população aparentemente homogênea sob estudo. Subgrupos ancestralmente distintos tendem a ter representações majoritárias de diferentes ancestralidades no nível genético e, assim, uma associação de um alelo super-representado nos pacientes em relação aos controles pode ser decorrente da maior frequência desse alelo na população ancestral predominante nos casos.

Uma maneira de corrigir o efeito da estratificação é a utilização dos pais de afetados como um controle interno, no intuito de detectar desequilíbrio na transmissão dos alelos (aplica-se nessa abordagem o teste TDT, do inglês, *transmission disequilibrium test*). Contudo, na prática é bastante difícil conseguir amostra dos pais dos pacientes (Tiwari *et al.*, 2008).

### 1.2.3. Estudos de expressão gênica

Os estudos de expressão baseiam-se na análise dos transcritos para o estudo de genes candidatos ou para a busca de novas vias gênicas diferencialmente reguladas em indivíduos com FL±P NS.

Diversos modelos animais vêm sendo empregados nos estudos de expressão, como camundongo, galinha e *zebrafish* (ou “paulistinha”), entre outros, e diversos genes foram caracterizados como de grande importância no processo da formação labial ou do fechamento do palato (Kondo *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2003; Mukhopadhyay *et al.*, 2004). Estudos em cultura celular de tecidos da região afetada de pacientes ou de células tronco também vêm sendo empregados para a investigação de processos biológicos importantes para a etiologia das FL±Ps NS (Bosi *et al.*, 1998; Jakobsen *et al.*, 2009; Baroni *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2010).

### 1.3. O uso de Marcadores de Ancestralidade na Caracterização de Populações

Muitos estudos têm se dedicado na caracterização de populações com o uso de marcadores informativos de ancestralidade (ou AIMS, do inglês *ancestry informative marker*), polimorfismos de frequências alélicas são substancialmente diferentes entre as populações. Entretanto, a quantidade de marcadores necessários para caracterizar ancestralmente uma população é alvo de debate. Recentemente, alguns estudos esforçaram-se em esclarecer essa questão (Tabela IV).

**Tabela IV-** Estudos envolvendo a caracterização de populações baseados em marcadores de ancestralidade. Embora os estudos tenham obtidos resultados semelhantes no agrupamento de populações nas 5 regiões maiores (no caso, continentes), houve algumas discrepâncias na estimativa da variabilidade genética entre indivíduos dentro de uma mesma população, entre populações dentro de uma região e entre regiões. Os indels foram os marcadores que mais detectaram a variabilidade entre continentes. STR: *Short Tandem Repeats* (microssatélites); RFLP: *restriction fragment length polymorphism* (polimorfismo de fragmento de restrição).

Referência	Barbujani <i>et al.</i> , 1997	Barbujani <i>et al.</i> , 1997	Romualdi <i>et al.</i> , 2002	Rosenberg <i>et al.</i> , 2002	Excoffier <i>et al.</i> , 2003	Bastos- Rodrigues <i>et al.</i> , 2006
Marcadores	RFLPs	STR	Inserções Alu	STR	STR	Indels
Nº loci	70	30	21	377	377	40
Nº populações	11	14	32	52	52	52
Nº regiões	5	5	5	5	5	5
Variabilidade entre indivíduos dentro da população (%)	84,5	84,5	82,9	93,2	87,6	85,7
Variabilidade entre populações de mesma região (%)	3,9	5,5	8,2	2,5	3,1	2,3
Variabilidade entre regiões (%)	11,7	10,0	8,9	4,3	9,2	12,1

Barbujani *et al.*, (1997) analisou 109 marcadores (30 microssatélites e 79 polimorfismos de fragmentos de restrição) em indivíduos de 16 populações. Romualdi *et al.*, (2002) analisou 21 inserções Alu em 32 populações. Rosenberg *et al.*, (2002) e Excoffier e Hamilton, (2003) agruparam 52 populações em 5 grandes

grupos geográficos (coincidentes com os continentes) utilizando-se de 377 microssatélites autossômicos. Bastos-Rodrigues *et al.*, (2006), utilizando apenas 40 marcadores indels dialélicos espalhados pelo genoma, caracterizou de forma muito satisfatória, em relação aos estudos anteriores, a estrutura do genoma das mesmas populações estudadas por Rosemberg *et al.* (2002) e Excoffier *et al.* (2003), obtendo a maior diferença genética entre regiões dentre esses estudos. Além do sucesso em caracterizar as populações, o uso dos marcadores indels apresentou também a vantagem da genotipagem por PCR-multiplex, com alelos de diferentes tamanhos amplificados em uma mesma reação. Outro grupo posteriormente implementou outro painel de 40 marcadores de inserção-deleção para a caracterização de populações brasileiras (Santos *et al.*, 2010).

A caracterização de marcadores capazes de identificar estrutura populacional e a validação de metodologias que contornem esse obstáculo são avanços especialmente úteis para a busca de genes associados às fissuras, pois, além da heterogeneidade e do padrão de herança multifatorial das FL±P NS, a estrutura populacional decorrente da mistura étnica também é um fator que dificulta essa busca, principalmente em países com histórico de miscigenação.

#### **1.4. Objetivo**

Como foi explicitado, a busca de genes de suscetibilidade às FL±Ps NS tem encontrado bastantes complicações, decorrentes da heterogeneidade da doença e seu padrão multifatorial de herança. Somada a elas, a estratificação populacional constitui uma dificuldade à parte especialmente em populações recentemente miscigenadas.



Sendo assim, é extremamente importante que possamos identificar variáveis e metodologias que contornem esses obstáculos.

O nosso objetivo principal é o de identificar genes de predisposição as FL±Ps NS. Considerando-se a heterogeneidade da doença, o padrão de herança multifatorial e as características da estrutura da nossa população, nos propusemos neste projeto de mestrado a:

- a) Caracterizar variáveis que possam interferir na busca dos fatores de risco genético desta malformação. Para isto, realizamos um estudo epidemiológico no qual estimamos, entre outras coisas, a herdabilidade e grau de consanguinidade de famílias com afetados por FL±Ps NS de várias regiões do país;
  - b) Avaliamos o uso de marcadores de ancestralidade do tipo inserção-deleção para corrigir o efeito da mistura étnica brasileira em estudos de caso-controle, em uma abordagem conhecida como *structured association*. Por meio dela, testamos duas regiões candidatas, as quais têm sido mais validadas: o gene *IRF6* e a região 8q24.
-

## Capítulo 5. Discussão Geral e Conclusões

---

O trabalho aqui apresentado visa à compreensão de parte do mecanismo etiológico das FL±Ps NS na população brasileira e integra duas importantes áreas da genética: a epidemiologia e a análise molecular. Tanto o estudo de herdabilidade quanto o da associação dos polimorfismos colocaram Barbalha como uma região promissora para o estudo das fissuras, e os pacientes dessa região devem ser foco mais detalhado de futuros estudos. Essa integração é especialmente valiosa no momento em que muitos dos recentes estudos de associação de varredura genômica têm dificuldades para encontrar variantes de grandes efeitos (individuais e cumulativos) que possam explicar o total do componente genético das FL±Ps NS. Nesses estudos, é bastante comum a utilização de uma amostra grande (frequentemente milhares de pacientes de diferentes populações) para aumentar o poder da abordagem de detectar variantes de efeitos menores. Porém, a presença de variantes de efeitos específicos para determinadas populações, bem como as diferentes contribuições dos fatores genéticos em cada população, pode fazer com que esses estudos busquem variantes comuns entre indivíduos que não compartilham tantas. Assim, restringir a análise a um grupo mais homogêneo e enriquecido de componentes genéticos pode ser uma alternativa interessante à mistura indiscriminada de populações. Essa alternativa é especialmente atraente considerando o alto custo de uma análise de varredura genômica em milhares de indivíduos; as informações epidemiológicas obtidas neste trabalho contribuirão de maneira significativa para um direcionamento do estudo aos pacientes mais promissores de se identificar variantes

de suscetibilidade. A ideia, portanto, é a de que uma amostra menor, porém qualitativamente melhor do ponto de vista genético, ofereça um grande poder estatístico para detectar variantes de efeitos menores. Para a identificação destas, um estudo de associação de varredura genômica neste momento mostra-se extremamente importante de ser realizado, visto que é uma abordagem que vem produzindo resultados importantes em outras populações.

O presente trabalho ainda admite duas análises importantes de serem realizadas em um futuro próximo, além das que foram apresentadas aqui. Uma referente ao polimorfismo rs2236906, em um íntron do *IRF6*, e outra ao fenótipo das FL±Ps NS.

O polimorfismo rs2236906 (intrônico do *IRF6*), genotipado para toda a amostra descrita no capítulo 4, apresentou-se em forte desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Por conta disso, optamos por excluí-lo provisoriamente da interpretação dos resultados, para não correremos o risco de enviesarmos os resultados devido a um possível problema metodológico. A análise desse SNP é importante principalmente por dois motivos. Primeiramente, ele próprio é um SNP funcional, já caracterizado como um *QTL* (*Quantitative trait locus*), dentro de um gene altamente correlacionado com as fissuras não sindrômicas, sendo assim um potencial SNP candidato. Segundo, a associação deste SNP funcionaria como um controle para os resultados obtidos do SNP do *enhancer* do *IRF6* (rs642961), pois, uma vez que esse último é constantemente descrito como a principal variante de suscetibilidade às FL±S NS, esperaríamos que a associação detectada para este fosse maior do que aquela detectada para o SNP intrônico (porém, no caso de haver forte desequilíbrio de ligação entre os dois SNPs na nossa amostra, o papel do SNP intrônico não poderá ser testado por essa abordagem, visto que o sinal de associação captado por ele poderia

refletir o efeito do SNP do *enhancer* do *IRF6*). No caso de não haver desequilíbrio de ligação entre eles, um resultado oposto indicaria que, ao contrário do que a maioria dos trabalhos propõe, esse SNP não é o mais determinante da região. Por isso, investiremos na busca do motivo pelo qual esse polimorfismo encontra-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg e na confirmação dos genótipos obtidos por sequenciamento direto da região, para posterior repetição das análises.

Estudos epidemiológicos realizados desde a década de 1960 apontam para uma diferença etiológica entre fissura de palato e fissura labial com ou sem fissura de palato. Alguns estudos moleculares e epidemiológicos recentes, entretanto, sugerem que o grupo “fissura labial com ou sem fissura de palato não sindrômica” (FL±P NS) pode, na verdade, conter dois grupos etiologicamente distintos (mas admitindo certa sobreposição de causas): fissura de lábio com fissura de palato (FL+P) e fissura de lábio isolada (FL). Evidências nesse sentido foram sugeridas em um estudo epidemiológico na Noruega (Harville *et al.*, 2005). Embora os próprios autores deste estudo considerem que muitos dos resultados obtidos são explicados simplesmente pela ideia de que FL+P seja somente uma forma mais grave de FL, alguns resultados foram curiosos, como, por exemplo, a predominância masculina em FL+P comparada a FL, e o risco maior de pais consanguíneos terem um filho com FL em relação à FL+P. Evidências moleculares para essa divisão foram observadas em Rahimov *et al.*, (2008), quando foi encontrada associação diferenciada do SNP do *enhancer* do *IRF6* quando a amostra de casos foi estratificada pelo fenótipo (FL+P e FL). Jugessur *et al.*, (2008), ao analisar seis SNPs na região do *IRF6*, encontrou forte associação na amostra de FL+P, mas não na de FL, reforçando a hipótese. Um estudo molecular mais recente na Noruega também encontrou associações diferenciadas entre os grupos: os genes *FGF12*, *IRF6*, *CX43* e *VCL* tiveram sinal detectado somente na

amostra de FL, e não na de FL+P, e os autores sugeriram que ao menos uma parte dos casos de FL é etiologicamente distinta de FL+P (Jugessur *et al.*, 2011). Com base nessa nova divisão etiológica, ainda pouco corroborada, é de nosso interesse futuro investigar na nossa amostra uma possível variação entre esses grupos na força da associação detectada e no risco que os SNPs conferem para a malformação. A importância da validação ou refutação dessa nova divisão fenotípica se dá tanto na análise molecular, uma vez que a fenotipagem é um passo de fundamental importância e indivíduos mal categorizados podem comprometer a análise de resultados, quanto na análise epidemiológica, uma vez que a maioria dos estudos realizados até então não separam esses dois grupos. Haverá ainda, caso confirmada essa divisão, um impacto no aconselhamento genético, uma vez que diferentes riscos de recorrências poderão ser revelados.

Por fim, este trabalho se utilizou de técnicas de discriminação de ancestralidade para testar a associação das regiões candidatas, procedimento que parece ser essencial de ser realizado na nossa população, haja vista os diferentes resultados produzidos pelos testes de qui-quadrado admitindo ausência de estratificação e posteriormente corrigindo para a estratificação. A discriminação ancestral foi realizada a partir de um painel de marcadores de inserção-deleção criado a partir de critérios estabelecidos em Bastos-Rodrigues *et al.* (2006), como diferentes frequências alélicas entre as populações ancestrais e frequências alélicas em europeus próximas de 0.5 (medida para evitar marcadores pouco polimórficos). Esse sistema revelou-se satisfatório na separação das ancestralidades e produziu resultados concordantes com trabalhos já realizados com esse intuito. Santarém, por exemplo, cidade localizada em uma região onde ainda existem muitas comunidades indígenas e onde o componente genômico indígena é maior comparado a outras regiões

brasileiras, apresentou a maior contribuição ameríndia (31%). Em um estudo também com indels, Santos *et al.* (2010) encontrou em Belém-PA uma contribuição ameríndia similar (27%), que também foi a maior daquele estudo, que contou também com populações do Sul do Brasil. A utilidade da genotipagem desse painel de indels nos pacientes vai além do presente trabalho, uma vez que qualquer variante candidata às fissuras pode ser rapidamente testada na amostra aqui descrita.

---

## Resumo

---

Fissura labial com ou sem fissura de palato não sindrômica (FL±P NS) é uma doença complexa que afeta 1:700 indivíduos no mundo. A busca das causas genéticas dessa malformação é dificultada pelo padrão multifatorial de herança e pela heterogeneidade genética, sendo que o gene *IRF6* e a região 8q24 são os *loci* de associação mais corroborada. A estratificação populacional é um problema adicional a ser considerado em estudos de caso-controle na população brasileira. No intuito de caracterizar variáveis que possam interferir na busca dos fatores de risco, realizamos em um primeiro estudo uma avaliação epidemiológica de pacientes de cinco localidades do país (Santarém-PA, Barbalha-CE, Fortaleza-CE, Maceió-AL e Rio de Janeiro-RJ) . Este estudo revelou Barbalha como a região onde a genética desempenha papel mais determinante (herdabilidade = 85%; risco de recorrência = 2,2-2,8%); Maceió, por outro lado, foi a região de menor influência genética (herdabilidade = 45%; risco de recorrência = 0,6-0,7%). Ainda, a consangüinidade não mostrou um mecanismo importante para explicar estes resultados. Em um segundo estudo, realizamos a caracterização da ancestralidade da amostra, com o intuito de estabelecermos parâmetros para serem utilizados em futuros estudos de associação na nossa população. Para testarmos as nossas hipóteses realizamos um estudo de caso-controle com os SNPs mais corroborados nos dois *loci* em outras populações: rs642961 em um enhancer do gene *IRF6* e rs987525 na região 8q24. Verificamos que quando realizamos um teste de associação para os SNPs com correção para estrutura populacional obtivemos resultados consistentes com as estimativas de herdabilidade, uma vez que Barbalha foi a única região de associação

positiva para os SNPs. Apesar de estes SNPs terem sido estudados em outras populações, este é o primeiro relato de associação destes SNPs na população brasileira. Ainda, o estudo molecular revelou a importância da caracterização da estrutura populacional por meio de marcadores informativos de ancestralidade em estudos de caso-controle na nossa população, uma vez que resultados diferentes puderam ser observados em análise assumindo ausência de estratificação. Este trabalho fornece importantes bases para a identificação de novos genes de predisposição às FL±P NS na população brasileira, pois permite um direcionamento para as populações de maior contribuição genética nas abordagens que virão a ser realizadas.

---



## Abstract

---

Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL±P) is a complex disease with worldwide incidence estimated as 1:700. The multifactorial model of inheritance and the genetic heterogeneity difficult the search for the genetic causes of NS CL±P, and, of all *loci*, *IRF6* gene and 8q24 gene desert are the two most associated. The population stratification constitutes an additional problem to be considered in case-control studies in Brazil. In order to identify the factors that may interfere in the hunting of risk factors, we carried out, in a first moment, an epidemiologic evaluation of patients from five locations in Brazil (Santarém-PA, Barbalha-CE, Fortaleza-CE, Maceió-AL and Rio de Janeiro-RJ). This study put Barbalha as the region where genetic factors play the more determinant role (heritability = 85%; recurrence risk = 2.2-2.8%); Maceió, on the other hand, was the region of less genetic contribution to the disease (heritability = 45%; recurrence risk = 0.6-0.7%). In addition, consanguinity did not appear to influence these results. In a second study, we characterized the sample ancestry, in order to establish parameters for future association studies in our population. To test our hypothesis, we carried out a case-control study with the SNPs which are the most corroborated in other populations: rs642961 (in an *IRF6* enhancer), and rs987525 (in 8q24). We verified that, when a structured association test was performed, we obtained results that are consistent with heritability estimates, since Barbalha was the only region with positive association for both SNPs. This was the first time that a positive association for these markers was reported in a Brazilian population. In addition, the molecular analysis evidenced the importance of an individual characterization with ancestry informative markers when

performing a case-control study in this population, since different results were obtained from the analyses assuming no stratification and correcting its effect. This study provides important bases for the identification of new susceptibility variants to NS CL±P in Brazilian population, since targeting in the populations of highest genetic contribution to the disease will be possible in the forthcoming studies, increasing the power of the study.

## Referências Bibliográficas

---

Altschuler, D., Daly, M. J. e Lander, E. S. Genetic Mapping in Human Disease. *Science*, v.322, n. 5903, Nov 7, p.881-8. 2008

Barbujani, G., A. Magagni, E. Minch e L. L. Cavalli-Sforza. An apportionment of human DNA diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.94, n.9, Apr 29, p.4516-9. 1997.

Baroni, T., C. Bellucci, C. Lilli, F. Pezzetti, F. Carinci, E. Lumare, A. Palmieri, G. Stabellini e M. Bodo. 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. *J Cell Physiol*, v.222, n.3, Mar, p.748-56. 2010.

Bastos-Rodrigues, L., J. R. Pimenta e S. D. Pena. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet*, v.70, n.Pt 5, Sep, p.658-65. 2006.

Beaty, T. H., J. C. Murray, M. L. Marazita, R. G. Munger, I. Ruczinski, J. B. Hetmanski, K. Y. Liang, T. Wu, T. Murray, M. D. Fallin, R. A. Redett, G. Raymond, H. Schwender, S. C. Jin, M. E. Cooper, M. Dunnwald, M. A. Mansilla, E. Leslie, S. Bullard, A. C. Lidral, L. M. Moreno, R. Menezes, A. R. Vieira, A. Petrin, A. J. Wilcox, R. T. Lie, E. W. Jabs, Y. H. Wu-Chou, P. K. Chen, H. Wang, X. Ye, S. Huang, V. Yeow, S. S. Chong, S. H. Jee, B. Shi, K. Christensen, M. Melbye, K. F. Doheny, E. W. Pugh, H. Ling, E. E. Castilla, A. E. Czeizel, L. Ma, L. L. Field, L. Brody, F. Pangilinan, J. L. Mills, A. M. Molloy, P. N. Kirke, J. M. Scott, M. Arcos-Burgos e A. F. Scott. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet*, v.42, n.6, Jun, p.525-9. 2010.

Bender, P. L. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs*, v.15, n.4, Aug, p.242-9. 2000.

Birnbaum, S., K. U. Ludwig, H. Reutter, S. Herms, M. Steffens, M. Rubini, C. Baluado, M. Ferrian, N. Almeida De Assis, M. A. Alblas, S. Barth, J. Freudenberg, C. Lauster, G. Schmidt, M. Scheer, B. Braumann, S. J. Berge, R. H. Reich, F. Schiefke, A. Hemprich, S. Potzsch, R. P. Steegers-Theunissen, B. Potzsch, S. Moebus, B. Horsthemke, F. J. Kramer, T. F. Wienker, P. A. Mossey, P. Propping, S. Cichon, P. Hoffmann, M. Knapp, M. M. Nothen e E. Mangold. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet*, v.41, n.4, Apr, p.473-7. 2009.

Bosi, G., R. Evangelisti, V. Valeno, F. Carinci, F. Pezzetti, C. Calastrini, M. Bodo e P. Carinci. Diphenylhydantoin affects glycosaminoglycans and collagen production by human fibroblasts from cleft palate patients. J Dent Res, v.77, n.8, Aug, p.1613-21. 1998.

Brown, N. L., L. Knott, E. Halligan, S. J. Yarram, J. P. Mansell e J. R. Sandy. Microarray analysis of murine palatogenesis: temporal expression of genes during normal palate development. Dev Growth Differ, v.45, n.2, Apr, p.153-65. 2003.

Bueno, D. F., D. Y. Sunaga, G. S. Kobayashi, M. Agüena, C. E. Raposo-Amaral, C. Masotti, L. A. Cruz, P. L. Pearson e M. R. Passos-Bueno. Human stem cell cultures from cleft lip/palate patients show enrichment of transcripts involved in extracellular matrix modeling by comparison to controls. Stem Cell Rev, v.7, n.2, Jun, p.446-57. 2010.

Calzolari, E., M. Milan, G. B. Cavazzuti, G. Cocchi, E. Gandini, C. Magnani, M. Moretti, G. P. Garani, G. P. Salvioli e S. Volpato. Epidemiological and genetic study of 200 cases of oral cleft in the Emilia Romagna region of northern Italy. Teratology, v.38, n.6, Dec, p.559-64. 1988.

Carinci, F., L. Scapoli, A. Palmieri, I. Zollino e F. Pezzetti. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, v.71, n.10, Oct, p.1509-19. 2007.

Centers of Disease control and prevention. Economic costs of birth defects and cerebral palsy – United States, 1992. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1995;44:694-699

Chevrier, C., B. Dananche, M. Bahuau, A. Nelva, C. Herman, C. Francannet, E. Robert-Gnansia e S. Cordier. Occupational exposure to organic solvent mixtures during pregnancy and the risk of non-syndromic oral clefts. Occup Environ Med, v.63, n.9, Sep, p.617-23. 2006.

Chiquet, B. T., S. S. Hashmi, R. Henry, A. Burt, J. B. Mulliken, S. Stal, M. Bray, S. H. Blanton e J. T. Hecht. Genomic screening identifies novel linkages and provides further evidence for a role of MYH9 in nonsyndromic cleft lip and palate. Eur J Hum Genet, v.17, n.2, Feb, p.195-204. 2009.

Christensen, K. e P. Fogh-Andersen. Cleft lip (+/- cleft palate) in Danish twins, 1970-1990. Am J Med Genet, v.47, n.6, Nov 1, p.910-6. 1993.

Deroo, L. A., A. J. Wilcox, C. A. Drevon e R. T. Lie. 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, n.6, Sep 15, p.638-46. 2008.

Dixon, M. J., M. L. Marazita, T. H. Beaty e J. C. Murray. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. Nat Rev Genet, v.12, n.3, Mar, p.167-78. 2011.

Dolk, H., J. Jentink, M. Loane, J. Morris e L. T. De Jong-Van Den Berg. Does lamotrigine use in pregnancy increase orofacial cleft risk relative to other malformations? Neurology, v.71, n.10, Sep 2, p.714-22. 2008.

Excoffier, L. e G. Hamilton. Comment on "Genetic structure of human populations". Science, v.300, n.5627, Jun 20, p.1877; author reply 1877. 2003.

Francomano, C. A., R. M. Liberfarb, T. Hirose, I. H. Maumenee, E. A. Streeten, D. A. Meyers e R. E. Pyeritz. The Stickler syndrome: evidence for close linkage to the structural gene for type II collagen. Genomics, v.1, n.4, Dec, p.293-6. 1987.

Gorlin, R. J., M. M. Cohen Jr e R. C. M. Hennekam. Syndromes of the Head and Neck, 4th edition. New York: Oxford University Press. 2001. 1283 p.

Grant, S. F., K. Wang, H. Zhang, W. Glaberson, K. Annaiah, C. E. Kim, J. P. Bradfield, J. T. Glessner, K. A. Thomas, M. Garris, E. C. Frackelton, F. G. Otieno, R. M. Chiavacci, H. D. Nah, R. E. Kirschner e H. Hakonarson. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. J Pediatr, v.155, n.6, Dec, p.909-13. 2009.

Harville, E. W., A. J. Wilcox, R. T. Lie, H. Vindenes e F. Abyholm. Cleft lip and palate versus cleft lip only: are they distinct defects? Am J Epidemiol, v.162, n.5, Sep 1, p.448-53. 2005.

Hernandez-Diaz, S., M. M. Werler, A. M. Walker e A. A. Mitchell. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. N Engl J Med, v.343, n.22, Nov 30, p.1608-14. 2000.

Hu, D. N., J. H. Li, H. Y. Chen, H. S. Chang, B. X. Wu, Z. K. Lu, D. Z. Wang e X. G. Liu. Genetics of cleft lip and cleft palate in China. Am J Hum Genet, v.34, n.6, Nov, p.999-1002. 1982.

Ingersoll, R. G., J. Hetmanski, J. W. Park, M. D. Fallin, I. Mcintosh, Y. H. Wu-Chou, P. K. Chen, V. Yeow, S. S. Chong, F. Cheah, J. W. Sull, S. H. Jee, H. Wang, T. Wu, T. Murray, S. Huang, X. Ye, E. W. Jabs, R. Redett, G. Raymond, A. F. Scott e T. H. Beaty. Association between genes on chromosome 4p16 and non-syndromic oral clefts in four populations. Eur J Hum Genet, v.18, n.6, Jun, p.726-32. 2010.

Jakobsen, L. P., R. Borup, J. Vestergaard, L. A. Larsen, K. Lage, L. L. Maroun, I. Kjaer, C. U. Niemann, M. Andersen, M. A. Knudsen, K. Mollgard e N. Tommerup. Expression analyses of human cleft palate tissue suggest a role for osteopontin and immune related factors in palatal development. Exp Mol Med, v.41, n.2, Feb 28, p.77-85. 2009.

Jiang, R., J. O. Bush e A. C. Lidral. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. Dev Dyn, v.235, n.5, May, p.1152-66. 2006.

Jugessur, A., P. G. Farlie e N. Kilpatrick. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. Oral Dis, v.15, n.7, Oct, p.437-53. 2009.

Jugessur, A. e J. C. Murray. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. Curr Opin Genet Dev, v.15, n.3, Jun, p.270-8. 2005.

Jugessur, A., F. Rahimov, R. T. Lie, A. J. Wilcox, H. K. Gjessing, R. M. Nilsen, T. T. Nguyen e J. C. Murray. Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway. Genet Epidemiol, v.32, n.5, Jul, p.413-24. 2008.

Jugessur, A., M. Shi, H. K. Gjessing, R. T. Lie, A. J. Wilcox, C. R. Weinberg, K. Christensen, A. L. Boyles, S. Daack-Hirsch, T. T. Nguyen, L. Christiansen, A. C. Lidral e J. C. Murray. Fetal genetic risk of isolated cleft lip only versus isolated cleft lip and palate: a subphenotype analysis using two population-based studies of orofacial clefts in scandinavia. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.91, n.2, Feb, p.85-92. 2011.

Kerrigan, J. J., J. P. Mansell, A. Sengupta, N. Brown e J. R. Sandy. Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. J R Coll Surg Edinb, v.45, n.6, Dec, p.351-8. 2000.

Kim, C. A., Bertola, D. R., Albano, L. M. J. Genética na Prática Pediátrica. Ed Manole. 620p. 2010.

Kondo, S., B. C. Schutte, R. J. Richardson, B. C. Bjork, A. S. Knight, Y. Watanabe, E. Howard, R. L. De Lima, S. Daack-Hirsch, A. Sander, D. M. McDonald-McGinn, E. H. Zackai, E. J. Lammer, A. S. Aylsworth, H. H. Ardinger, A. C. Lidral, B. R. Pober, L. Moreno, M. Arcos-Burgos, C. Valencia, C. Houdayer, M. Bahuau, D. Moretti-Ferreira, A. Richieri-Costa, M. J. Dixon e J. C. Murray. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. Nat Genet, v.32, n.2, Oct, p.285-9. 2002.

Krapels, I. P., C. Vermeij-Keers, M. Muller, A. De Klein e R. P. Steegers-Theunissen. Nutrition and genes in the development of orofacial clefting. Nutr Rev, v.64, n.6, Jun, p.280-8. 2006.

Letra, A., R. Menezes, R. F. Fonseca, M. Govil, T. Mchenry, M. J. Murphy, J. D. Hennebold, J. M. Granjeiro, E. E. Castilla, I. M. Orioli, R. Martin, M. L. Marazita, B. C. Bjork e A. R. Vieira. Novel cleft susceptibility genes in chromosome 6q. J Dent Res, v.89, n.9, Sep, p.927-32. 2010.

Lie, R. T., A. J. Wilcox e R. Skjaerven. A population-based study of the risk of recurrence of birth defects. N Engl J Med, v.331, n.1, Jul 7, p.1-4. 1994.

Lin, Y. C., L. J. Lo, M. S. Noordhoff e Y. R. Chen. Cleft of the lip and palate in twins. Changcheng Yi Xue Za Zhi, v.22, n.1, Mar, p.61-7. 1999.

Loffredo, L. C. M., J. A. S. Freitas e A. A. G. Grigolli. Prevalence of oral clefts from 1975 to 1994, Brazil. Rev Saúde Pública, v.35, n.6, p.571-5. 2001.

Mangold, E., K. U. Ludwig, S. Birnbaum, C. Baluardo, M. Ferrian, S. Herms, H. Reutter, N. A. De Assis, T. A. Chawa, M. Mattheisen, M. Steffens, S. Barth, N. Kluck, A. Paul, J. Becker, C. Lauster, G. Schmidt, B. Braumann, M. Scheer, R. H. Reich, A. Hemprich, S. Potzsch, B. Blaumeiser, S. Moebus, M. Krawczak, S. Schreiber, T. Meitinger, H. E. Wichmann, R. P. Steegers-Theunissen, F. J. Kramer, S. Cichon, P. Propping, T. F. Wienker, M. Knapp, M. Rubini, P. A. Mossey, P. Hoffmann e M. M. Nothen. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. Nat Genet, v.42, n.1, Jan, p.24-6. 2009.

Marazita, M. L., L. L. Field, M. E. Cooper, R. Tobias, B. S. Maher, S. Peanchitlertkajorn e Y. E. Liu. Genome scan for loci involved in cleft lip with or without cleft palate, in Chinese multiplex families. Am J Hum Genet, v.71, n.2, Aug, p.349-64. 2002.

Menegotto, B. G. e F. M. Salzano. Clustering of malformations in the families of South American oral cleft neonates. J Med Genet, v.28, n.2, Feb, p.110-3. 1991a.

Menegotto, B. G. e F. M. Salzano. Epidemiology of oral clefts in a large South American sample. Cleft Palate Craniofac J, v.28, n.4, Oct, p.373-6; discussion 376-7. 1991b.

Moreno, L. M., M. A. Mansilla, S. A. Bullard, M. E. Cooper, T. D. Busch, J. Machida, M. K. Johnson, D. Brauer, K. Krahn, S. Daack-Hirsch, J. L'heureux, C. Valencia-Ramirez, D. Rivera, A. M. Lopez, M. A. Moreno, A. Hing, E. J. Lammer, M. Jones, K. Christensen, R. T. Lie, A. Jugessur, A. J. Wilcox, P. Chines, E. Pugh, K. Doheny, M. Arcos-Burgos, M. L. Marazita, J. C. Murray e A. C. Lidral. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. Hum Mol Genet, v.18, n.24, Dec 15, p.4879-96. 2009.

Mukhopadhyay, P., R. M. Greene, W. Zacharias, M. C. Weinrich, S. Singh, W. W. Young, Jr. e M. M. Pisano. Developmental gene expression profiling of mammalian, fetal orofacial tissue. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.70, n.12, Dec, p.912-26. 2004.

Nagem Filho, H. e D. R. Martins. [Teamwork in the rehabilitation of patients with lesions of lip and palate]. Estomatol Cult, v.2, n.1, Jan-Jun, p.127-32. 1968.

Nordstrom, R. E., T. Laatikainen, T. O. Juvonen e R. E. Ranta. Cleft-twin sets in Finland 1948-1987. Cleft Palate Craniofac J, v.33, n.4, Jul, p.340-7. 1996.

Pradat, P., E. Robert-Gnansia, G. L. Di Tanna, A. Rosano, A. Lisi e P. Mastroiacovo. First trimester exposure to corticosteroids and oral clefts. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.67, n.12, Dec, p.968-70. 2003.

Rahimov, F., M. L. Marazita, A. Visel, M. E. Cooper, M. J. Hitchler, M. Rubini, F. E. Domann, M. Govil, K. Christensen, C. Bille, M. Melbye, A. Jugessur, R. T. Lie, A. J. Wilcox, D. R. Fitzpatrick, E. D. Green, P. A. Mossey, J. Little, R. P. Steegers-Theunissen, L. A. Pennacchio, B. C. Schutte e J. C. Murray. Disruption of an AP-

2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. Nat Genet, v.40, n.11, Nov, p.1341-7. 2008.

Rogers, C. R., S. M. Weinberg, T. D. Smith, F. W. Deleyiannis, M. P. Mooney e M. L. Marazita. Anatomical basis for apparent subepithelial cleft lip: a histological and ultrasonographic survey of the orbicularis oris muscle. Cleft Palate Craniofac J, v.45, n.5, Sep, p.518-24. 2008.

Romualdi, C., D. Balding, I. S. Nasidze, G. Risch, M. Robichaux, S. T. Sherry, M. Stoneking, M. A. Batzer e G. Barbujani. Patterns of human diversity, within and among continents, inferred from biallelic DNA polymorphisms. Genome Res, v.12, n.4, Apr, p.602-12. 2002.

Rosenberg, N. A., J. K. Pritchard, J. L. Weber, H. M. Cann, K. K. Kidd, L. A. Zhivotovsky e M. W. Feldman. Genetic structure of human populations. Science, v.298, n.5602, Dec 20, p.2381-5. 2002.

Santos, N. P., E. M. Ribeiro-Rodrigues, A. K. Ribeiro-Dos-Santos, R. Pereira, L. Gusmao, A. Amorim, J. F. Guerreiro, M. A. Zago, C. Matte, M. H. Hutz e S. E. Santos. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. Hum Mutat, v.31, n.2, Feb, p.184-90. 2010.

Schutte, B. C. e J. C. Murray. The many faces and factors of orofacial clefts. Hum Mol Genet, v.8, n.10, p.1853-9. 1999.

Stanier, P. e G. E. Moore. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. Hum Mol Genet, v.13 Spec No 1, Apr 1, p.R73-81. 2004.

Stoll, C., Y. Alembik, B. Dott e M. P. Roth. Epidemiological and genetic study in 207 cases of oral clefts in Alsace, north-eastern France. J Med Genet, v.28, n.5, May, p.325-9. 1991.

Tenconi, R., M. Clementi e L. Turolla. Theoretical recurrence risks for cleft lip derived from a population of consecutive newborns. J Med Genet, v.25, n.4, Apr, p.243-6. 1988.

Tiwari, H. K., J. Barnholtz-Sloan, N. Wineinger, M. A. Padilla, L. K. Vaughan e D. B. Allison. Review and evaluation of methods correcting for population stratification with a focus on underlying statistical principles. Hum Hered, v.66, n.2, p.67-86. 2008.

Tolarova, M. M. e J. Cervenka. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. Am J Med Genet, v.75, n.2, Jan 13, p.126-37. 1998.

Van Den Boogaard, M. J., M. Dorland, F. A. Beemer e H. K. Van Amstel. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. Nat Genet, v.24, n.4, Apr, p.342-3. 2000.



Van Der Woude, A. Fistula Labii Inferioris Congenita and Its Association with Cleft Lip and Palate. Am. J. Hum. Genet. 6: 244-56 p. 1954.

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, Jul, p.216-25. 1987.

Weinberg, S. M., C. A. Brandon, T. H. Mchenry, K. Neiswanger, F. W. Deleyiannis, J. E. De Salamanca, E. E. Castilla, A. E. Czeizel, A. R. Vieira e M. L. Marazita. Rethinking isolated cleft palate: evidence of occult lip defects in a subset of cases. Am J Med Genet A, v.146A, n.13, Jul 1, p.1670-5. 2008.

Wilcox, A. J., R. T. Lie, K. Solvoll, J. Taylor, D. R. Mcconnaughey, F. Abyholm, H. Vindenes, S. E. Vollset e C. A. Drevon. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. Bmj, v.334, n.7591, Mar 3, p.464. 2007.

Wyszynski, D. F. e T. H. Beaty. Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. Teratology, v.53, n.5, May, p.309-17. 1996.

Zucchero, T. M., M. E. Cooper, B. S. Maher, S. Daack-Hirsch, B. Nepomuceno, L. Ribeiro, D. Caprau, K. Christensen, Y. Suzuki, J. Machida, N. Natsume, K. Yoshiura, A. R. Vieira, I. M. Orioli, E. E. Castilla, L. Moreno, M. Arcos-Burgos, A. C. Lidral, L. L. Field, Y. E. Liu, A. Ray, T. H. Goldstein, R. E. Schultz, M. Shi, M. K. Johnson, S. Kondo, B. C. Schutte, M. L. Marazita e J. C. Murray. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. N Engl J Med, v.351, n.8, Aug 19, p.769-80. 2004.

## Web Sites

Arlequin 3.5 (software): <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>

Marshfield database: <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/home/index.asp>

OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

Operação Sorriso: <http://www.operationsmile.org.br/novo/>

Phase (software): <http://stephenslab.uchicago.edu/software.html>

STRAT (software): <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/STRAT.html>

Structure (software): <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software.html>