

ALINE LOURENÇO DA SILVA

**Análise de genes candidatos para
fissuras orais não sindrômicas em
famílias com recorrência**

**Botucatu
2007**

ALINE LOURENÇO DA SILVA

**Análise de genes candidatos para
fissuras orais não sindrômicas em
famílias com recorrência**

**Orientador: Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira
Co-orientadora: Prof Dra Lucilene Arilho R. Bicudo**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, área de concentração: Genética.**

**Botucatu
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Silva, Aline Lourenço da.

Análise de genes candidatos para fissuras orais não sindrômicas em famílias com recorrência / Aline Lourenço da Silva. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Lucilene Arilho R. Bicudo

Assunto CAPES: 20200005

1. Lábios – Anomalias e deformidades. 2. Palato. 3. Genes - Análise.

CDD 575.12

Palavras chave: Anomalias craniofacial; Fissuras orais; Genes candidatos; Lábio e palato; Recorrência familiar.

DEDICATÓRIAS

Agradeço a Deus pelas bênçãos que recebo a cada dia e que me dão força para atingir os grandes objetivos da minha vida.

Dedico este trabalho a toda minha família que sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando a nunca desistir e chegar ao objetivo final.

Agradeço aos meus pais Anselmo e Ivani os quais sempre foram meu ponto de referência, que me apoiaram, incentivaram e estiveram sempre presentes em cada momento desta conquista.

Agradeço em especial ao meu marido Raul que esteve ao meu lado o tempo todo mesmo quando a distância insistia em doer em nossos corações.

“Amar não consiste em fitar um ao outro, mas, em olhar juntos para a mesma direção”.

AGRADECIMENTOS

A todas as famílias de pacientes participantes deste projeto, vocês foram a base de todo este trabalho.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente deste projeto, assistentes sociais, enfermeiros, motoristas, vizinhos, amigos e parentes das famílias que auxiliaram nas coletas, recados, transporte, a ajuda de vocês foi essencial e de grande importância.

Ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais por ter aprovado e proporcionado as condições necessárias para que o trabalho fosse desenvolvido e pela oportunidade de trabalhar com seus pacientes.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade e pelos ensinamentos que recebi ao longo da minha pós-graduação.

Ao Conselho nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido.

À Fundação Lucentis pelo auxílio no início deste trabalho.

Ao meu orientador Prof Dr Danilo Moretti-Ferreira e a minha co-orientadora Prof Dra Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo pela orientação, ensinamentos, estímulo, por me ensinar a desempenhar um trabalho de forma independente e pela oportunidade de desenvolver mais este trabalho.

Ao Dr Jeffrey C Murray pela grande oportunidade de trabalhar junto ao seu grupo, pelos valiosos ensinamentos, pelo estímulo, por ter me ensinado a grandeza de amar o trabalho que se desempenha, por todo o carinho e atenção durante o período que permaneci sob sua orientação.

A todo o grupo do Murray's Lab, University of Iowa, a todos aqueles que me receberam com carinho e atenção, que me ensinaram e orientaram, especialmente a Susie Mc'Connel, Adela Mansilla, Melanie Devore, Marla Johnson, Lina e George Uribe, Kathy Frees, Adrianna Mostoswka e a todos os outros com os quais convivi durante esse período de grande aprendizagem.

À equipe do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) pela boa convivência com todos, especialmente aos amigos Nádia Bérgamo e Rodrigo Luiz.

À equipe de Genética do Centrinho pela convivência e ajuda durante o desenvolvimento do projeto, em especial à Renata, João e Rubens pela ajuda nas coletas e localização de pacientes.

Aos funcionários da Seção de Pós – Graduação pelo auxílio e ajuda prestados.

A todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho ou do meu convívio durante a execução do mesmo.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	45
3. ARTIGO CIENTÍFICO – versão em português	46
4. ARTIGO CIENTÍFICO – versão em inglês	68
5. REFERÊNCIAS	89
ANEXO I Termo de consentimento livre e esclarecido	125
ANEXO II Termo de consentimento livre e esclarecido - controle	128
ANEXO III Autorização do CONEP	132

RESUMO

As fissuras orais como as de lábio e/ou palato (FL/P) são defeitos congênitos comuns com uma frequência de aproximadamente 1 a cada 700 nascidos vivos. Tanto fatores genéticos como ambientais contribuem para a etiologia das fissuras de lábio e/ou palato (FL/P). Estudos com genes candidatos têm revelado mutações ou associação com a forma não sindrômicas das FL/P (FL/P-NS). Em famílias com 2 ou mais indivíduos afetados em gerações consecutivas pode-se levantar a hipótese de que mutações em genes únicos seriam encontradas mais frequentemente do que em famílias em que as FL/P aparecem como fenômeno isolado. Para explorar esta hipótese mais detalhadamente, analisamos um total de 176 famílias com recorrência materna e paterna de FL/P-NS através de estudos de desequilíbrio de ligação e testes de associação com 7 genes candidatos (*IRF6*, *TGFA*, *MSX1*, *FGFR1*, *FOXE1*, *BMP4* e *TGFB3*), bem como sequenciamento direto de 4 dos genes citados acima: *IRF6*, *MSX1*, *BMP4* e *FOXE1*, os quais já foram publicados mutações causadoras de fissuras orais. Os testes de associação - TDT (Teste de Desequilíbrio de Transmissão) - não mostraram resultados de substancial impacto para as SNPs analisadas. Quando as famílias foram divididas em subgrupos de genitores afetados, observamos uma sugestão de associação com o gene *TGFB3*. No sequenciamento foram encontradas 2 mutações, as quais podem ser consideradas etiológicas. Concluímos que, no geral, mutações em um único gene não são a causa principal das FL/P-NS mesmo em famílias com 2 ou mais gerações consecutivas como as estudadas neste trabalho. Isso reforça a complexidade da etiologia das FL/P-NS e a necessidade de esforços adicionais nos estudos de interações gene-gene e gene-ambiente mesmo naquelas famílias que parecem fornecer fortes componentes genéticos.

ABSTRACT

Oral clefts are common birth defects with an estimated frequency of 1 in 700 live births. Both genetic and environmental triggers are recognized as contributing to the etiology of clefts of the lip and/or palate. A handful of candidate genes have shown either mutations or associations with isolated forms of clefts. In families in which two generations or more of individuals are affected with clefting, it could be hypothesized that single gene contributions might be more frequent than in families in which the cleft appears as an isolated phenomenon. To explore this hypothesis in more detail, we carried out linkage disequilibrium, association tests with seven strong candidate genes (*IRF6*, *TGFA*, *MSX1*, *FGFR1*, *FOXE1*, *BMP4* e *TGFB3*), as well as direct sequencing of four of these (*IRF6*, *MSX1*, *BMP4* and *FOXE1*). Only two mutations were identified in a screen of approximately 180 families with two generations of affected individuals that might be considered etiologic. In addition, tests of association using transmission disequilibrium testing on the families failed to show substantial significance for single gene SNP interactions. When the families were segregated by looking at affects contributed to by the affected parent only, there were weak effects observed with $TGF\beta$ -3. In the aggregate, the single gene contribution doesn't seem to be the major cause of nonsyndromic clefts in families with two generations or more of individuals which reinforces the need for additional efforts to look at gene-by-gene interactions even in those families which appear to have the strongest underlying genetic components.

1. INTRODUÇÃO

As fissuras orais são um defeito congênito comum, facilmente reconhecível e resultam da falha de fusão do lábio e palato durante o desenvolvimento embrionário. Fissuras de lábio podem ser observadas como fenômenos uni ou bilaterais, isoladas ou acompanhadas por fissura do palato; a fissura de palato também pode ser observada como um fenômeno isolado e pode ser parcial ou completa. Todos esses tipos citados são comumente referidos como fissuras orais.

Em 1998, o “National Center for Health Statistics” relatou que uma em cada cinco mortes entre crianças foi devido a defeitos de nascimento, e as fissuras orais eram o segundo defeito congênito mais comum. Entre as crianças sobreviventes, um estudo relatou que crianças com fissura de lábio e palato geralmente apresentam peso e estatura menores que as crianças controles e também sinais de restrição de crescimento intra-uterino (RCIV) (Becker et al., 1998). Além disso, as fissuras de lábio e palato levam à dificuldade na alimentação devido à pobre sucção, resultando em problemas com nutrição e ganho de peso nas primeiras semanas de vida (Clarren et al., 1987). Assim sendo, as fissuras orais representam um grande problema de saúde pública devido à necessidade de suporte médico, psicológico, fonoaudiológico, nutricional e odontológico por período prolongado. Crianças portadoras de fissuras orais têm um risco aumentado para otites médias crônicas, o que pode levar à perda auditiva (Kenaloglu et al., 1999; Paradise et al., 1969).

Em revisão da literatura Endrigo & Kapp-Simon (1999) descreveram que 30 a 40% das crianças estudadas apresentaram algum tipo de dificuldade de aprendizagem e dificuldade de interação social. Adultos com fissuras orais,

especialmente fissura de palato apresentam um risco elevado para anomalias cerebrais estruturais, especialmente diferenças de tamanho do cérebro e cerebelo que podem contribuir para algumas deficiências cognitivas (Nopoulos et al., 2002).

A descoberta de fatores genéticos envolvidos na etiologia das fissuras orais pode gerar benefícios diretos e melhorar o diagnóstico, o tratamento, e até mesmo a prevenção desses defeitos congênitos, aumentando o conhecimento a respeito do desenvolvimento craniofacial.

Estudos sugerem que aproximadamente 70% dos casos de fissura de lábio e/ou palato (FL/P) e 50% dos casos de FP são não sindrômicos (NS), ou seja, não estão associados a qualquer outra anomalia física e/ou de desenvolvimento (Milerad et al., 1997; Saal, 1998, 2000; Tolarova & Cervenka, 1998; Stoll et al., 2000). Os casos sindrômicos podem ser subdivididos entre as mais de 400 síndromes mendelianas conhecidas (Online Mendelian Inheritance in Man: <http://www.ncbi.nlm.gov/omim>), síndromes de herança não caracterizada e aqueles resultantes de ação teratogênica.

As causas das FL/P-NS são complexas, envolvendo tanto fatores genéticos como ambientais, caracterizando a herança multifatorial. Este fato proporciona amplas oportunidades para identificar genes candidatos, explorar interações gene-ambiente e aprender mais sobre embriologia humana e seus distúrbios (Murray, 2002).

Embriologia

O desenvolvimento da região orofacial depende da interação de vários fatores incluindo diferenciação, crescimento, adesão, sinalização celular, e apoptose. Distúrbios nos genes controladores desses mecanismos e/ou a inibição desses genes, por agentes teratogênicos, pode ser uma causa aparente para malformações como as fissuras orais (Prescott et al., 2001).

O mesênquima da face primordial surge a partir de células da crista neural que rompem o limite ectodermal – mesenquimal e migram para o tecido adjacente como células ectomesênquimais. A migração e a proliferação dessas células são essenciais para o desenvolvimento facial. As famílias gênicas *homeobox*, *SHH* (sonic hedgehog), *OXT* (orthodontical), *GSC* (gosecoid), *DLX* (distalless), e *MSX* (muscle segment) expressam-se no ectomesênquima derivado da crista neural. Muitos destes são genes candidatos para estar envolvidos na etiologia das fissuras orofaciais.

Desenvolvimento do lábio

O primeiro dos cinco arcos branquiais é a origem do tecido que irá formar o lábio e o palato primário, este é composto por mesoderma e células da crista neural (Ito et al., 2003). Os arcos branquiais surgem em torno do estomódio, ou boca primária, durante a 4^a semana de desenvolvimento humano: a proeminência frontonasal, duas proeminências maxilares bilaterais e duas proeminências bilaterais mandibulares (Ferguson et al., 2000).

Durante a 5^a semana de desenvolvimento de ambos os lados da parte inferior da elevação frontonasal formam-se espessamentos bilaterais denominados placóides nasais. Saliências nasais médias e laterais em forma de ferradura desenvolvem-se ao redor dos placóides nasais. As saliências maxilares

crecem e se aproximam uma da outra e das saliências nasais mediais. Na 6^a e 7^a semanas gestacionais, as saliências nasais mediais fundem-se uma com a outra e com as saliências maxilares (Diewart & Shiota, 1990; Carstens, 2002). Ao se fundirem as saliências maxilares mediais formam o segmento intermaxilar da maxila. Este segmento origina: (1) filtro do lábio superior, (2) parte pré-maxilar da maxila e gengiva associada, e (3) palato primário. As porções laterais do lábio superior, a maior parte da maxila e o palato secundário são formados a partir das saliências maxilares (Moore, 1993). Por volta da 8^o semana de desenvolvimento o nariz é formado pela fusão das proeminências nasais médias. Caso o filtro nasal não seja preenchido por tecido conjuntivo adicional, a fusão neste ponto pode falhar conforme o crescimento e desenvolvimento da região. Essa falha pode ocorrer uni ou bilateralmente gerando, a fissura de lábio (Brand & Isselhard, 2003).

Desenvolvimento do palato

O palato é composto por duas partes: o palato primário, parte frontal correspondente a 10% do palato, e o palato secundário, correspondente aos 90% restantes. O desenvolvimento do palato ocorre entre a 5^a e 12^a semana de desenvolvimento.

O palato primário é formado pela fusão das proeminências nasais médias durante as 6^a e 7^a semanas de desenvolvimento. Em seguida, uma massa de mesoderma forma-se entre as proeminências maxilares originando o palato primário, que inclui os 4 dentes incisivos maxilares.

O desenvolvimento do palato secundário começa durante a 6^a semana, quando folhetos palatais crescem a partir das proeminências maxilares. Esses

folhetos ficam posicionados verticalmente de ambos os lados da língua. Durante a sétima semana, a língua move-se para baixo e os folhetos palatais começam a se elevar tomando a posição horizontal por cima da língua. Durante a 8ª semana, os folhetos palatais horizontais aproximam-se na região média. A fusão desses folhetos um ao outro começa durante a 9ª semana, começando pelo meio e movendo-se anterior e posteriormente ao mesmo tempo. Durante este processo, o epitélio medial dos dois folhetos se fundem. Este epitélio entre os dois folhetos desaparece dando espaço a um tecido uniforme composto por células mesenquimais (Moore & Persaud, 1990; Kerrigan et al., 2000).

A migração e apoptose das células epiteliais, como também a transformação das células epiteliais em mesenquimais, têm sido sugeridos como mecanismo para a eliminação da junção epitelial, mas este processo ainda não é totalmente entendido (Cuervo & Covarrubias 2004; Takahara et al., 2004; Martinez-Alvarez et al., 2000).

A fissura de palato resulta de uma falha de fusão no palato primário, do secundário ou de ambos. O fenótipo pode variar desde úvula bífida a completa fissura do palato e pode ocorrer isoladamente ou em conjunto com a fissura de lábio. A fissura de palato pode ocorrer devido a uma falha em um dos três principais processos de desenvolvimento do palato: crescimento dos folhetos palatais, elevação dos folhetos palatais sobre a língua ou fusão.

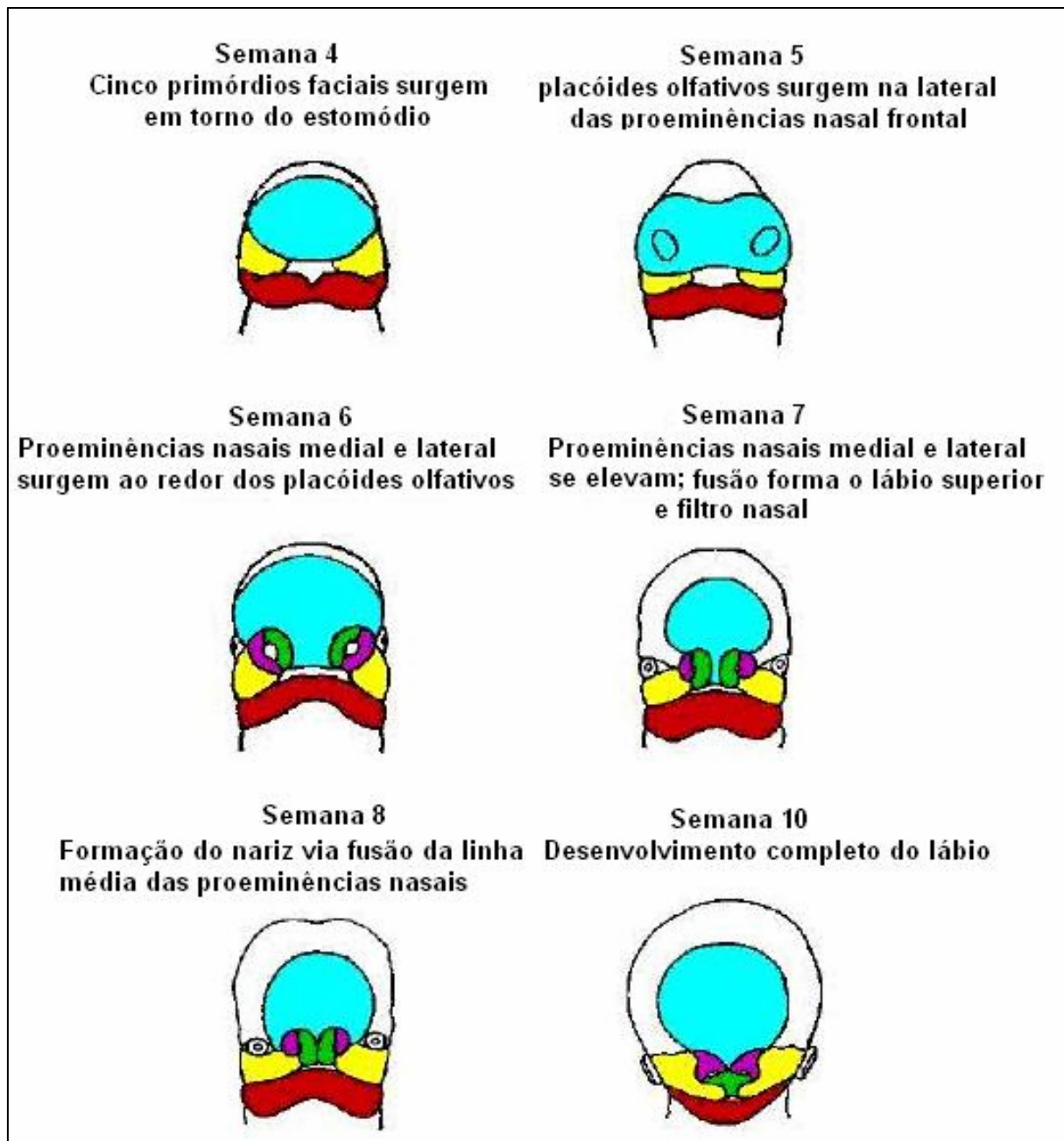


Figura 1: desenvolvimento normal da face em humanos, as cores representam as seguintes proeminências: azul=frontonasal, amarelo=maxilares, vermelho=mandibulares, roxo=nasais laterais e verde=nasais mediais (adaptada a partir de imagens obtidas no website: <http://www.biomed2.man.ac.uk/ugrad/biomedical/calpage/sproject/rob/images/gh.gif>)

Classificação e fenótipo

A classificação das fissuras orais pode ser feita baseando-se em aspectos variados como, por exemplo, aspectos morfológicos (Tolarova & Cervenka, 1998) e aspectos embriológicos (Kriens, 1990; Kernahan, 1990). A classificação adotada pelo Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais HRAC –

USP/Bauru (Centrinho) tem como ponto de referência o forame incisivo (Stark, 1954), tendo sido adaptada por Spina et al., 1972.

Esse sistema permite a classificação das fissuras orais nos seguintes grupos:

- Pré-forame incompleta: unilateral direita ou esquerda, ou bilateral

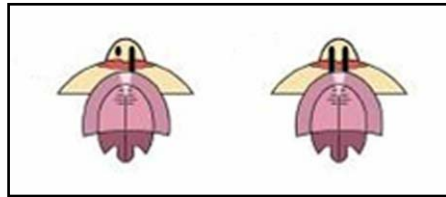


Figura 2: representação das fissuras pré-forame incompletas.

- Pré-forame completa: unilateral direita ou esquerda, ou bilateral

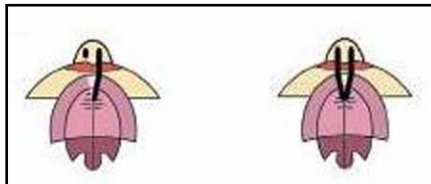


Figura 3: representação das fissuras pré-forame completas.

- Pós-forame completa
- Pós-forame incompleta

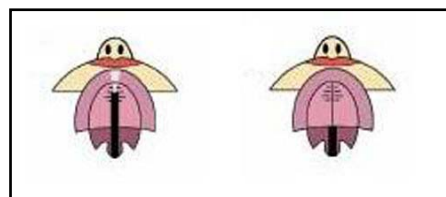


Figura 4: representação das fissuras pós-forame completa e incompleta respectivamente

- Trans-forame: unilateral direita ou esquerda, ou bilateral

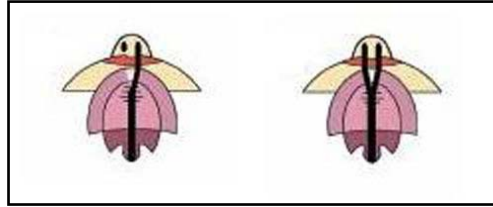


Figura 5: representação das fissuras trans-forame.

As fissuras pré-forame são aquelas que atingem o lábio, uni ou bilateralmente (incompleta) podendo chegar até o forame incisivo (incluindo fissura do palato primário), quando então são chamadas de completa. As fissuras pós-forame são aquelas que atingem o palato secundário, podendo atingir somente a parte mole (incompleta) como também as partes mole e dura do palato secundário (completa). As fissuras que atingem apenas a úvula também são chamadas de pós-forame. As fissuras trans-forame são aquelas que têm início no lábio, passam pelo forame incisivo e atingem o palato secundário.

Fissura de lábio e/ou palato *versus* fissura de palato isolada

A FL/P é mais comum que a FL ou FP isoladas, correspondendo a aproximadamente 50% dos casos contra 25% de FL e 25% de FP (Gorlin, 2001). Fogh-Andersen (1942) relatou que FL/P e FP podem ter causas genéticas distintas quando observou que probandos com FL/P raramente tinham parentes com FP. Dos 703 casos estudados, apenas 0,07% dos parentes de crianças com FL/P tinham FP, e a maioria desses eram parentes de segundo grau ou mais. O oposto também era verdadeiro; apenas 0,24% dos parentes de crianças com FP

apresentavam FL/P, e novamente, eram parentes distantes. Se a FL/P e a FP fossem geneticamente relacionadas, seria esperada a ocorrência mais freqüente de ambas em famílias com vários indivíduos afetados. Além disso, nenhum dos pares de gêmeos, especialmente os monozigóticos, apresentaram ambas FL/P e FP, reforçando a idéia de que são entidades genéticas distintas. Por essa razão, as FL/P e FP são estudadas separadamente quando se trata de fatores genéticos (Fogh-Andersen,1942).

Fissura sindrômica *versus* não sindrômica

As FL/P podem ocorrer isoladamente ou em conjunto com outros sinais clínicos que caracterizam uma síndrome como, por exemplo, anomalias estruturais, atraso de desenvolvimento ou características dismórficas. Estudos sugerem que aproximadamente 70% dos casos de FL/P e 50% dos casos de FP são não sindrômicos (NS), ou seja, não estão associados a qualquer outra anomalia física e/ou de desenvolvimento (Milerad et al., 1997; Saal, 1998, 2000; Tolarova & Cervenka, 1998; Stoll et al., 2000). Os casos sindrômicos podem ser subdivididos entre as mais de 400 síndromes mendelianas conhecidas (Online Mendelian inheritance in man: <http://www.ncbi.nlm.gov/omim>), síndromes de herança não caracterizada e aqueles resultantes de ação teratogênica. A forma sindrômica mais comum de FL/P é a síndrome de van der Woude (VWS) (OMIM# 119300), uma síndrome de herança autossômica dominante causada por mutação no gene *IRF6*.

A busca por mutações em genes envolvidos nos casos sindrômicos de FL/P ou FP pode ajudar a desvendar o papel dos mesmos na etiologia das FL/P-NS. Algumas formas sindrômicos de FL/P podem ser classificadas erroneamente

como não sindrômicas devido à variabilidade fenotípica das mesmas como, por exemplo, em casos da síndrome de van der Woude na qual a ausência das fístulas no lábio inferior torna o diagnóstico indiferenciável das FL/P-NS na ausência de um histórico familiar que possa ajudar. Aproximadamente 15% dos casos de VWS não apresentam as fístulas do lábio inferior sendo, portanto, clinicamente indistinguíveis dos casos de FL/P-NS (Burdick et al., 1985). Outras síndromes cujo fenótipo inclui FL/P são as síndromes: Displasia Ectodérmica e Ectrodactilia (*EEC1*) (OMIM#604292) (Celli et al., 1999); Displasia Ectodérmica da Ilha Margarita (OMIM#225060) (Sozen et al., 2001); anquiloglossia e fissura de palato ligados ao X (OMIM#303400) (Braybrook et al., 2001); hipodontia ou anomalias dentárias associada a FL/P mais características ectodérmicas causadas por mutações no gene *MSX1* (Vastardis et al., 1996; van den Boogard et al., 2000; Jumlorgras et al., 2001).

A VWS é um excelente modelo para se estudar o desenvolvimento craniofacial; é uma das únicas síndromes em que a fissura dos palatos primário e secundário ocorre isolada ou em combinação em uma mesma família. Um fato importante que pode ser observado devido à expressividade variável da VWS é o de que as fissuras observadas nos casos de VWS são indistinguíveis das fissuras não sindrômicas.

Estudos recentes relatam possível envolvimento do locus da VWS na etiologia das FL/P-NS (Houdayer et al., 2001; Zuccherro et al., 2004; Ghassibe et al., 2006). Houdayer et al., (2001) sugerem uma possível relação entre o locus da síndrome van der Woude e as FL/P-NS, na qual este locus agiria como modificador na etiologia das FL/P-NS. O estudo desenvolvido por Zuccherro et al., (2004) mostrou que dentre as dez populações estudadas apenas o grupo da

população brasileira pertencente à amostra revelou uma possível associação do gene *IRF6* com as FL/P-NS. Esses dados apresentados por Zuccherro et al., dão suporte a estudos mais detalhados deste gene em amostras da população brasileira.

Fissuras de lábio e/ou palato não sindrômicos

Incidência

As FL/P-NS estão entre os defeitos congênitos mais comuns ocorrendo em aproximadamente 1 a cada 700 nascidos vivos com a incidência variando de acordo com a origem étnica e geográfica, sexo do embrião e *status* socioeconômico (Murray, 2000; Mossey & Little, 2002).

Indígenas americanos e asiáticos têm a maior incidência (1/500 nascimentos) seguida pelos caucasianos (1/1000 nascimentos), enquanto que os africanos apresentam a menor incidência (1/2500 nascimentos) (Croen et al., 1998; Murray et al., 1997; Kromberg e Jenkins, 1982; Mossey & Little, 2002).

Alguns estudos indicam que filipinos e chineses nascidos nos Estados Unidos, com uma melhor condição socioeconômica, têm uma menor incidência de FL/P e FP-NS do que aqueles nascidos em seus próprios países (Murray et al., 1997; Croen et al., 1998; Tolarova e Cervenka, 1998). Estes dados dão suporte aos achados de que indivíduos nascidos em condições socioeconômicas mais baixas têm um risco aumentado para FL/P-NS (Chung et al., 1987; Cembrano et al., 1995). As diferenças observadas entre os diferentes *status* socioeconômicos podem estar relacionadas a fatores ambientais como ingestão de vitaminas, nutrição ou assistência médica disponível.

As FL-NS unilaterais são mais freqüentes que as bilaterais. Entre as FL unilaterais, o lado esquerdo é mais freqüentemente afetado que o direito. A razão entre as FL unilaterais esquerdas, fissuras unilaterais direitas e fissuras bilaterais é de 6:3:1, respectivamente (Lettieri, 1993).

Razão entre os sexos

Existe uma diferença entre a incidência das FL/P-NS entre os sexos masculino e feminino. As fissuras orais não sindrômicas, de um modo geral, são mais freqüentes nos homens que nas mulheres numa razão de 2H:1M (Tolarova, 1987; Loffredo et al., 2001; Wyszynski, 2002) (figura 3). Quando as FL/P-NS são analisadas separadamente, também existem diferenças entre os sexos. Para fissura de lábio (FL) observa-se uma relação de 1,5 H: 1 M (figura 3); e para fissura de lábio e palato (FL/P), uma razão de 2 H:1 M (Fraser , 1960; Fraser, 1980; Owens et al., 1985). Ao contrário disso, a fissura de palato (FP) é mais comum nas mulheres, ocorrendo numa razão de 1,5 M: 1 H (Wyszynski, 2002) (figura 3). Além disso, existem evidências de que esta razão H:M aumenta de acordo com a severidade do fenótipo (Fogh-Anderson, 1942). Existem diferenças no tempo do desenvolvimento do palato entre os sexos, o que poderia contribuir para essas diferenças de incidência.

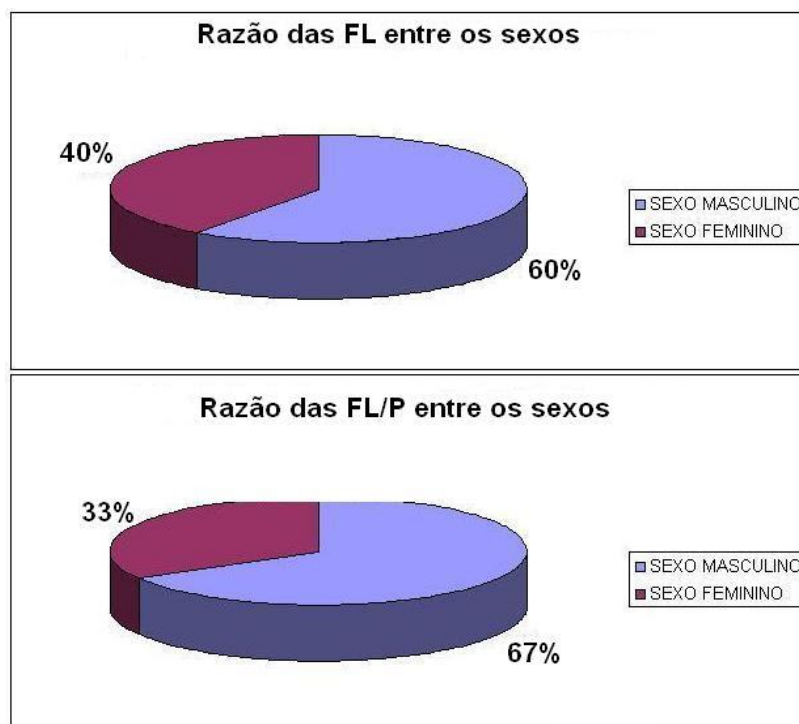


Figura 6: Razão entre as FL e FL/P entre os sexos

Risco de recorrência

O risco de recorrência consiste na chance de um parente do probando afetado também vir a ser afetado e varia de acordo com fatores como: severidade da fissura, número de indivíduos afetados na família, sexo do indivíduo afetado e, grau de parentesco com o indivíduo afetado. Casos mais severos estão associados a risco de recorrência mais elevado (Wyszynski, 2002).

A razão do risco de recorrência consiste no risco da doença para o parente do probando dividido pelo risco para a população em geral e geralmente é utilizada para o cálculo do risco de recorrência (λR) (Penrose, 1953). O risco de recorrência está relacionado ao grau de parentesco, sendo que o risco é maior para parentes mais próximos do indivíduo afetado. Para doenças monogênicas, por exemplo, $\lambda_{irmã(o)-1} = 2 (\lambda_{tio} - 1)$ (Mitchell & Risch, 1993). Para doenças poli

ou oligogênicas, a λR diminui significativamente com o número de genes de menor efeito, $\lambda_{irmã(o)} = \lambda_{tio}^2$ (Farrall & Holder, 1992).

Segundo Gorlin et al. (2001), os riscos de recorrência para as FL/P e FP seguem o seguinte padrão apresentado na Figura 7.

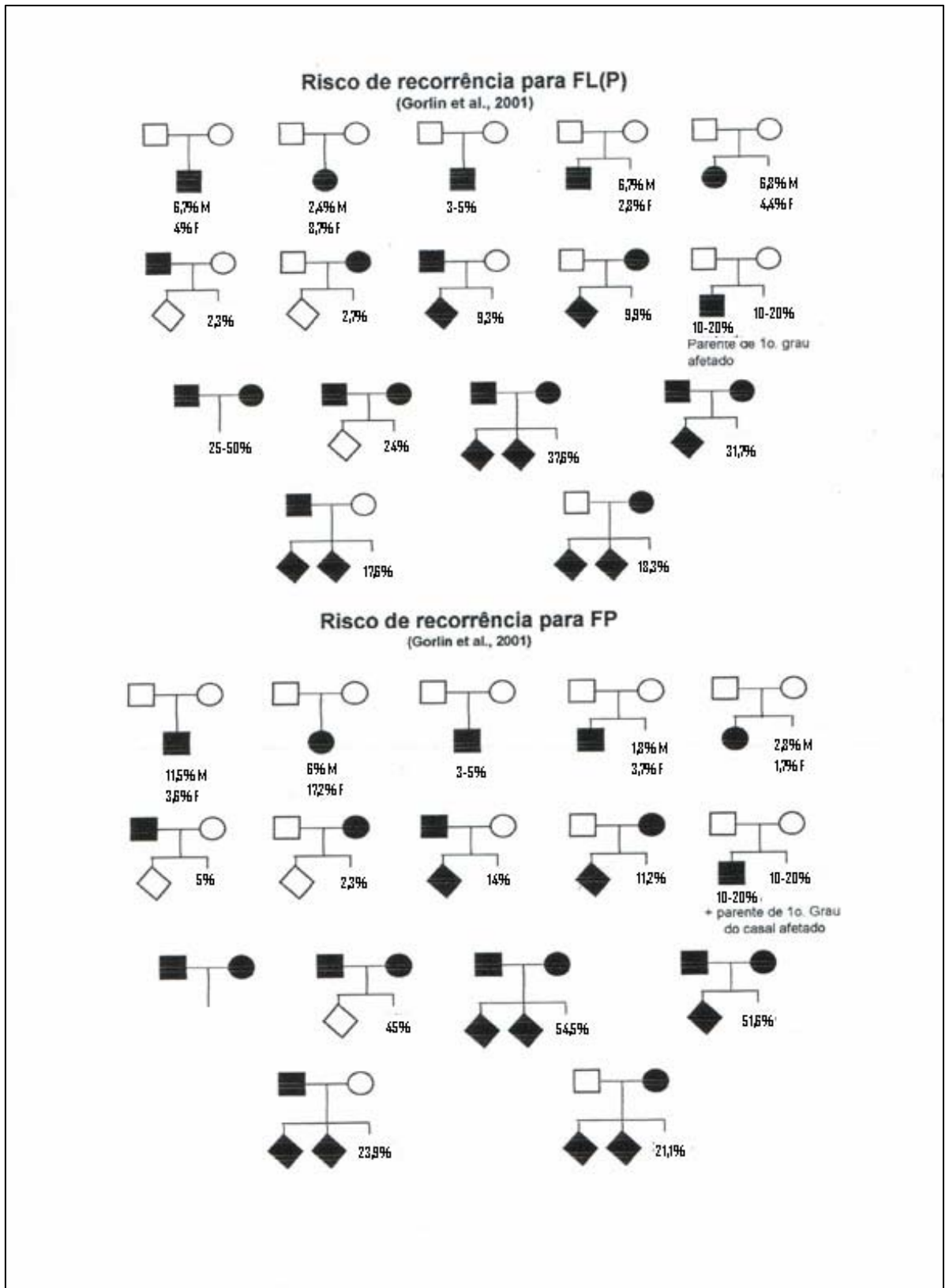


Figura 7: esquema dos riscos de recorrência de FL/P e FP-NS em vários padrões de famílias (adaptado de Gorlin et al., 2001).

Etiologia

A etiologia das FL/P-NS é complexa e envolve tanto fatores genéticos como ambientais.

Na década de 40 Paul Fogh-Andersen, baseado em estudo de população, relatou que as FL/P-NS têm forte componente genético (Fogh-Andersen, 1942). Nessa mesma década, Josef Warkany propôs que anomalias craniofaciais poderiam ser causadas também por exposição a fatores ambientais (Warkany et al., 1943). Desde então, vários estudos com modelos animais, estudos genéticos e epidemiológicos têm sido usados para identificar fatores envolvidos no desenvolvimento facial, em particular nas dismorfologias craniofaciais (Murray, 1995). Vários estudos têm estimado que de 3 a 14 genes interagem e podem estar envolvidos na etiologia das FL/P, o que faz destas uma anomalia heterogênea (Schliekelman et al., 2002).

Fatores ambientais

A identificação dos fatores ambientais envolvidos na etiologia de uma doença é de grande importância na medida em que, conhecendo-se tanto os fatores genéticos como os ambientais, podemos manipular os fatores ambientais de indivíduos identificados como geneticamente predispostos na tentativa de tratamento ou mesmo prevenção dessas doenças (Lidral et al., 1998; Lidral & Moreno, 2005).

Existem diversos fatores ambientais conhecidos que podem estar relacionados à etiologia das FL/P-NS por desempenhar algum papel durante o desenvolvimento craniofacial. Tais fatores incluem o nível de ácido fólico e exposição a tabaco e álcool durante a vida uterina. Estes fatores são de especial interesse uma vez que poderiam ser controlados pela mãe durante a gestação a

fim de minimizar o possível efeito na etiologia das FL/P-NS (Bender et al., 2000). Eles ainda sugerem vias de genes que podem ser importantes para o desenvolvimento das FL/P-NS.

Alguns estudos de exposição ao folato incluem tantos suplementos como antagonistas. Um estudo desenvolvido por Jordan et al. (1977) com camundongos e ratos mostrou que a exposição a antagonistas do ácido fólico antes do período de desenvolvimento do palato resultou em 75 a 80% de embriões sobreviventes portadores de malformações como FL/P. Alguns estudos com seres humanos mostraram que a suplementação materna com folato reduz o risco de recorrência de FL/P-NS para mulheres que já tem uma criança com fissura (Tolarova e Harris 1995; Shaw et al., 1995; Czeizel et al., 1999; Itikala et al., 2001). O estudo de Czeizel et al. (1999) sugeriu que uma dose alta de ácido fólico pode ser crucial enquanto que Itikala et al., (2001) mostraram que o benefício da suplementação apenas ocorre quando a mesma for efetuada antes do segundo e o terceiro mês de gestação, sendo preferencial a suplementação desde o período periconcepcional. O suposto envolvimento do folato na etiologia das FL/P-NS leva ao estudo de genes envolvidos nas vias metabólicas do folato (Shaw et al., 1995; Mills et al., 1999; Wyszynski et al., 2000; de Paula, 2003).

Os estudos sobre o envolvimento do tabagismo materno na etiologia das FL/P-NS são contraditórios, porém, as evidências do envolvimento deste fator ambiental estão aumentando conforme mais estudos são desenvolvidos. Alguns estudos têm relatado associação do tabagismo materno durante a gestação (Shiono et al., 1986; Werler et al., 1990). O efeito parece ser dose-dependente, ou seja, quanto mais cigarros a mãe consumir por dia maior o risco para o feto (Beaty et al., 1997; Chung et al., 2000; Lorente et al., 2000).

Um meta-análise de 24 estudos realizada recentemente relatou um aumento no risco para FL/P e FP de 1.34 (1.25-1.44) e 1.22 (1.10-1.35) respectivamente, devido ao tabagismo materno durante a gestação. Os autores caracterizam a associação como moderada, porém, estatisticamente significativa (Little et al., 2004).

Alguns estudos ainda têm investigado o envolvimento do consumo materno de álcool durante a gestação com o aumento do risco para FL/P para o embrião. Um estudo desenvolvido por Munger et al. (1996) revelou que mulheres que consomem de 1 a 3 doses de bebida alcoólica por mês aumenta em 1.5 o risco para seu feto, sendo que este risco aumenta para 3.1 quando a mulher consome de 4 a 10 doses e para 4.7 vezes quando a mãe consome mais de 10 doses por mês, indicando um efeito dose-resposta. Estudos com modelos animais como camundongo e galinha sugerem que a exposição ao álcool influencia o desenvolvimento das células da crista neural, um dos tipos de células que compõem o lábio e o palato (Kotch & Sulik, 1992; Cartwright et al., 1995).

Fatores genéticos e métodos de análise

As evidências de que o desenvolvimento das FL/P-NS envolve fatores genéticos vêm de estudos com gêmeos e famílias com vários indivíduos afetados. Vários estudos mostraram que a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos é de aproximadamente 40% enquanto que entre gêmeos dizigóticos esta taxa é por volta de 5%. Se a etiologia das FL/P-NS fosse apenas genética, a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos deveria ser de

100%. Entretanto, essas taxas sugerem que existe o fator genético, mas, também existem fatores ambientais envolvidos (Metrakos et al., 1958; Mitchell & Risch 1992; Christensen & Fogh-Andersen, 1993).

Outras evidências de que fatores genéticos estão envolvidos na etiologia das FL/P-NS vêm do fato de que as FL/P-NS ocorrem mais frequentemente entre parentes de portadores de fissuras orais do que na população em geral. Fogh-Andersen (1942) demonstrou que a frequência de FL/P-NS era 40 vezes maior entre irmãos de probandos com fissuras orais do que na população em geral. Esta frequência também era aumentada entre outros parentes, mas, essa frequência diminuía de acordo o distanciamento do grau de parentesco.

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de determinar regiões cromossômicas e genes que podem estar envolvidos na etiologia das FL/P-NS; diferentes modelos de herança têm sido testados como herança mendelianas, modelos poligênicos, e a combinação de ambos e diferentes métodos de análise estatística têm sido utilizados para desenvolvê-los. Dentre estes os dois tipos de estudos mais comuns para elucidar as causas genéticas das FL/P-NS são: análise de ligação e estudo de associação. A análise de ligação é utilizada para o estudo de famílias e observa a segregação de marcadores genéticos em determinadas regiões do genoma juntamente com o fenótipo estudado. Se o marcador estudado está perto o suficiente do locus da doença, então os marcadores tendem a segregar juntos em todos os indivíduos afetados da família, enquanto que os mesmo podem ser herdados por indivíduos não afetados de acordo com segregação mendeliana. Este tipo de análise pode ser realizada de forma paramétrica ou não paramétrica.

De acordo com o método paramétrico, um modelo de herança é utilizado como parâmetro para se calcular a razão da probabilidade (likelihood ratio) para o

indivíduo ser afetado caso o gene da doença esteja ligado ao marcador *versus* o gene da doença não estar ligado ao mesmo marcador.

O método não paramétrico não requer um modelo de herança como parâmetro. Este consiste em determinar quando parentes afetados são portadores de um mesmo alelo de determinado marcador mais frequentemente que o esperado pela lei de Hardy-Weimberg. A taxa de probabilidade resultante de um teste paramétrico é relatada como LOD score, que é o \log_{10} dessa taxa (likelihood ratio). Em doenças mendelianas, LOD scores acima de 3 são considerados indicativos de ligação. Porém, para doenças complexas nas quais pode haver múltiplas etiologias, um LOD score maior que 1 é considerado o suficiente para se investigar. Nas análises não paramétricas, o resultado é dado sob a forma de um p indicativo de quanto além do esperado os indivíduos afetados em um heredograma compartilham alelos do marcador estudado. Estudos não paramétricos são conservativos, portanto pes menores que 0,05 ocorrem menos frequentemente que o esperado, existindo a chance de um resultado falso positivo. Assim sendo, mais marcadores devem ser adicionados à região de interesse para melhorar o resultado da análise (Kruglyak et al., 1996).

Estudos de associação são a identificação de correlação não aleatória (associação) entre alelos em 2 loci na população utilizando-se da hipótese de que existe um ancestral comum do qual a mutação foi herdada. Isso resultaria em alelos compartilhados para marcadores próximos a mutação entre indivíduos afetados, enquanto que, a recombinação ocorrida na população em geral durante o tempo, resultaria numa distribuição aleatória dos marcadores fora da região da mutação. A análise de ligação procura por co-segregação de alelos para marcadores genéticos com uma doença dentro de famílias. Os estudos de associação têm mais poder uma vez que se utilizam da

combinação de ambas as associação e ligação e pode ser bem utilizado para estudos de doenças complexas (Horikawa et al., 2000).

Para doenças complexas como as FL/P-NS, a análise de ligação geralmente é desenvolvida sob a forma de ligação por triagem do genoma, ou seja, vários marcadores são selecionados por todo o genoma e genotipados em um conjunto de famílias. Estes marcadores são avaliados para ligação como fenótipo de interesse. As regiões que apresentarem resultados que sugiram ligação com o fenótipo são então investigadas mais detalhadamente utilizando-se estudos de ligação e/ou associação.

A análise de associação é um teste de co-ocorrência de alelos e fenótipos em uma população ao invés de uma família. Se indivíduos portadores de um determinado fenótipo tiverem um determinado alelo em um determinado marcador mais frequentemente do que aqueles que não possuem o fenótipo, pode-se dizer que o alelo em questão está associado ao fenótipo estudado. A associação pode ser resultado do fato de o marcador ser causador do fenótipo, ou seja, o fato de ter o alelo e o fator patogênico que torna o indivíduo susceptível ao fenótipo, ou ser devido a um desequilíbrio de ligação caso o marcador esteja ligado à mutação causadora da doença.

O método caso-controle geralmente é utilizado em estudos de associação, porém, a seleção dos indivíduos controles é um fator crucial para o sucesso do estudo uma vez que a associação pode ser resultado de estratificação populacional (Strachan e Read 1999). Para resolver este problema, alguns métodos têm sido utilizados. Estes métodos avaliam a associação, utilizando membros da família como controles.

O TDT (Teste de Desequilíbrio de Transmissão) é o método mais utilizado e considerado um teste de associação na presença de ligação, uma vez que o teste utiliza a herança em núcleos familiares para testar a associação e tem como base o estudo de famílias, analisando a associação entre uma doença complexa e um marcador genético localizado em um gene candidato ou próximo a ele. Este teste avalia a transmissão de alelos de marcadores de pais heterozigotos para seus filhos afetados e determina se a transmissão para o grupo de probandos é estatisticamente diferente do esperado pelas leis mendelianas. Por exemplo: o esperado para a transmissão de um SNP de um dos pais heterozigotos seria em torno de 50% para cada alelo, caso o alelo não esteja na região relacionada à causa do fenótipo.

Os resultados do TDT são dados sob a forma de p , sendo valores menores que 0,05 considerados significativos. Esse tipo de análise tem como vantagem o fato de não exigir grandes famílias, porém, o número de famílias estudadas deve ser grande, e ainda é necessário que os pais sejam heterozigotos uma vez que o teste avalia a transmissão dos alelos de ambos os pais de forma independente. Isso pode reduzir o número de amostras informativas que podem ser submetidas a este tipo de análise.

Regiões e Genes candidatos

O grupo de genes responsáveis pelas FL/P-NS não é composto apenas por aqueles envolvidos no desenvolvimento das estruturas da cabeça e da face, mas também por aqueles que são influenciados por perturbações ambientais durante o desenvolvimento embriológico (Prescott et al., 2001). Avanços nas análises quantitativas e moleculares têm feito dos estudos de ligação e

associação ótimos métodos de investigação (Mitchell et al., 2002). Estes métodos têm auxiliado muito na identificação de genes e loci candidatos para as formas não síndromicas. Modelos animais, particularmente o camundongo, têm contribuído significativamente para a compreensão destes distúrbios e tornaram-se um meio adicional para testar genes candidatos através do estudo de fissuras surgidas espontaneamente nestes animais ou geradas através de mutações em camundongos “*knockouts*”. A seleção dos genes candidatos é também realizada baseando-se em suas propriedades funcionais, no local e momento de expressão, na localização cromossômica ou na homologia com modelos animais (Prescott et al., 2001). O processo pelo qual cada gene candidato específico interfere no desenvolvimento facial varia de acordo com suas funções (Murray, 1995). Uma outra forma de seleção de genes candidatos para as FL/P-NS atualmente utilizada é o estudo de genes envolvidos nas formas síndromicas das FL/P sendo que, para as FL/P-NS, a fenocópia mais adequada seria a síndrome de van der Woude, uma doença autossômica dominante que é a forma síndromica mais comum de FL/P e apresenta como diagnóstico diferencial das FL/P-NS, fístulas no lábio inferior e ocasional hipodontia.

Alguns genes e regiões cromossômicas têm sido associados as FL/P-NS, os genes citados a seguir estão entre os mais importantes deles.

TGFA (Fator de Crescimento Transformante alfa)

Os fatores de crescimento transformantes são polipeptídios biologicamente ativos que apresentam homologia de aproximadamente 40% com o fator de crescimento epidermal (EGF) e compete com o mesmo na ligação com o receptor de EGF, estimulando sua fosforilação produzindo resposta mitogênica (Online

Mendelian inheritance in man: <http://www.ncbi.nlm.gov/omim>). O gene *TGFA* está localizado na região cromossômica 2p11-p13, possui 6 éxons e codifica uma proteína de 160 aminoácidos.

A atividade do *TGFA* foi demonstrada em certas linhagens de células sugerindo que este gene está envolvido não só na neoplasia, mas também contribui para a regulação do crescimento normal das células (Stoll et al., 1992). Uma pesquisa de homologia feita no BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) revelou de 68 a 91% de identidade entre o *TGFA* humano e do camundongo (Machida et al., 1999).

Este foi o primeiro gene a ser associado às FL/P-NS em um estudo desenvolvido por Ardinger et al. (1989) utilizando o polimorfismo Taq I em um estudo de associação. Estudos que mostram associação do gene *TGFA* com as FL/P-NS indicam que este gene exerce um efeito modesto no risco para indivíduos parentes de pessoas afetadas com FL/P-NS (Chenevix-Trench et al., 1991; Mitchell & Risch, 1992; Farrall et al., 1993).

Foram feitos estudos em várias populações caucasianas como: australiana (Chenevix-Trench et al., 1991), inglesa (Holder et al., 1992), francesa (Stoll et al., 1992), norte americana (Sassani et al., 1993; Feng et al., 1994; Pezzeti et al., 1998) entre outras que mostraram associação do gene com as FL/P. Machida et al. (1999) relataram 5 variantes em regiões não codificantes conservadas do gene encontradas em seus casos, mas não em 278 controles (Machida et al., 1999).

Moreno et al. (2004) e Schultz et al. (2004) relataram resultados de associação positiva para este gene. Vieira et al. (2005) encontraram 9 variantes raras e não codificantes no gene *TGFA* diferentes das 5 variantes relatadas

previamente em amostras da população brasileira e também não encontraram nenhuma mutação codificante que pudesse ser etiológica. Alguns estudos não mostraram associação do gene *TGFA* em populações caucasianas (Hecht et al., 1991; Vintiner et al., 1992; Christensen et al., 1999; Lidral et al., 1998) permanecendo a controvérsia. Além disso, camundongos “*knockouts*” para o gene *TGFA* não apresentaram fissuras (Luetke et al., 1993), sugerindo que o gene *TGFA* pode agir como um modificador ao invés de ser um gene principal (Murray, 1995).

***MSX1* (Muscle Segment Homeobox)**

Os genes da família *MSX* são genes *homeobox* e estão relacionados ao desenvolvimento do organismo durante a embriogênese. Estes genes atuam subdividindo o embrião em grupos celulares, os quais apresentam potencial para se transformar em tecidos e órgãos específicos. As proteínas codificadas pelos genes *homeobox* possuem em comum um homeodomínio altamente conservado entre as espécies, cuja função é reconhecer seqüências específicas de DNA nos genes alvo, visando controlar a expressão destes por meio de ativação ou depressão das vias sinal-transdução (Ivens et al., 1990; Hewitt et al., 1991; Holland, 1991; Bell et al., 1993; Wyszynski, 2002).

O gene *MSX1* está localizado na região cromossômica 4p16.1, possui 2 éxons, codifica uma proteína de 297 resíduos e regiões altamente conservadas entre as espécies, o que sugere um papel importante no desenvolvimento.

Alguns estudos com modelos animais mostram que camundongos *knockouts* para o gene *MSX1* apresentam FP e outras anomalias craniofaciais incluindo agenesia dentária e maxila reduzida (Satokata e Maas, 1994). Além

disso, o gene *MSX1* se expressa em áreas de interação epitélio-mesênquima no mesoderma, ectoderma e neuroepitélio como também em áreas suturais, processos faciais, arcos branquiais, olhos, dentes, glândulas salivares, mamárias e membros (Davidson, 1995; Wang e Sassoon, 1995; Jowett et al., 1993; Jaskoll et al., 1998; Kim et al., 1998; Thesleff, 1996; Peters e Balling, 1999; Zhang et al., 1997). Múltiplas linhas de evidências sugerem que o gene *MSX1* está envolvido na promoção do crescimento e inibição da diferenciação (Blin-Wakkach et al., 2001; Hu et al., 2001). Uma disrupção no crescimento causada por mutações no *MSX1* poderia causar um atraso do crescimento facial e conseqüentemente uma fissura de palato primário ou secundário, consistente com modelos animais (Satokata et al., 1994; Wang et al., 1995).

Estudos de associação do *MSX1* com FL/P e FP-NS dão suporte para o papel do gene no desenvolvimento de fissuras em diferentes populações (Maestri et al., 1997; Lidral et al., 1998; Romitti et al., 1999; Blanco et al., 2001; Beaty et al., 2001; Jugessur et al., 2003) inclusive em populações sul americanas (Vieira et al., 2003). Estes estudos indicam associação de uma variável alélica intrônica do gene com as FL/P-NS. Um estudo recente desenvolvido por Fallin et al., (2003) confirma a associação entre a região de repetição CA intrônica do gene e as FL/P-NS e ainda identifica 8 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene. Foi encontrada sugestão de associação entre dois destes SNPs e as fissuras orais no grupo estudado.

Mutações etiológicas foram encontradas no gene *MSX1*. O relato de uma mutação sem sentido no éxon 1 do gene *MSX1* em uma família que apresenta uma combinação de FP, FL/P e agenesia dentária e também em uma família com a síndrome Witkop (OMIM#189500), a qual inclui agenesia dentária, sugere que

mutações deste podem estar presentes particularmente em casos familiares (van den Boogaard et al., 2000; Jumlongras et al., 2001). Além disso, mutações no gene *MSX1* têm sido encontradas em aproximadamente 2% dos casos de FL/P, mostrando que uma parte dos casos de FL/P-NS é devido a mutações neste gene (Jezewski et al., 2003; Suzuki et al., 2004; Vieira et al., 2005).

***TGFB3* (Fator de Crescimento Transformante Beta 3)**

Os fatores de crescimento transformantes codificados pelos genes *TGFB* são moléculas sinalizadoras extracelulares que influenciam a regulação do desenvolvimento em vertebrados e invertebrados. Eles desempenham papel importante na embriogênese através de interações epitélio-mesênquima, proliferação celular, condrogênese e apoptose (Wyszynski, 2002). Estes fatores de crescimento são codificados pela família gênica *TGF* que inclui os genes: *TGFA*, *TGFB1*, *TGFB2* e *TGFB3*.

O gene *TGFB3* está localizado na região cromossômica 14q24 e se expressa principalmente nas células do epitélio da parte medial dos folhetos palatais. Ele é importante na adesão do epitélio medial e eliminação do epitélio entre os folhetos logo após a fusão (Proetzel et al., 1995). O gene possui 7 éxons e codifica uma proteína de 412 aminoácidos, apresenta regiões altamente conservadas alternadas com regiões de menor conservação entre as espécies estudadas.

Estudos feitos com modelos animais mostraram que o gene *TGFB3* tem papel importante na palatogênese uma vez que camundongos *knockouts* apresentaram FP devido a uma falha na fusão do palato (Kaartinen et al., 1997; Proetzel et al., 1995; Sanford et al., 1997). Tem sido demonstrado que o *TGFB3*

age no palato como membro de vias de sinalização estimulando a proliferação celular na linha média do epitélio, resultando na falha da fusão do palato (Cui et al., 2003).

Os resultados de estudos com o gene *TGFB3* e fissuras orais ainda são controversos, com relatos mostrando associação deste gene com as FL/P-NS (Sato et al., 2001; Beaty et al., 2002, Kim et al., 2003; Ichikawa et al., 2006) enquanto outros mostram a não associação do mesmo com a FL/P-NS (Lidral et al., 1998; Tanabe et al., 2000; Vieira et al., 2003). Outros genes como *BMP4* e *PAX9* estão localizados próximos ao gene *TGFB3* e também foram associados às FL/P quando inativados em camundongos (Liu et al., 2005; Peters et al., 1999).

***BMP4* (Proteína morfogenética do osso 4)**

O gene *BMP4* está localizado na região cromossômica 14q22-q23 e possui 4 éxons e codifica uma proteína de 408 aminoácidos. Esta proteína age como uma molécula reguladora vital que age no desenvolvimento atuando na indução do mesoderma, desenvolvimento dos dentes, formação dos membros, indução óssea e reparo de fraturas (Online Mendelian inheritance in man: <http://www.ncbi.nlm.gov/omim>). Em estudos de expressão do gene demonstraram que o gene *Bmp4* ativa a expressão do *Msx1* no desenvolvimento dos dentes incisivos em camundongos. Thomas et al., (2000) relataram que o gene *BMP4* se co-expressa juntamente com o gene *DLX2* no epitélio oral distal e que regula a expressão deste. Eles demonstraram que o *BMP4* e o *Fgfr8* cooperam e regulam a expressão do *Dlx2* no epitélio e mesênquima do primeiro arco branquial no desenvolvimento de camundongos.

Este gene apresenta papel significativo na interação epitelial-mesenquimal que precede a formação dos dentes (Vainio et al., 1993). A distribuição dos BMPs durante o desenvolvimento orofacial sugere importante papel dos mesmos. Por exemplo, no dia 9,5 de prenhez de um camundongo, o *BMP4* é expresso no epitélio dos processos maxilares e mandibulares (Bennett et al., 1995).

***IRF6* (Fator de Regulação Interferon 6)**

O gene *IRF6* pertence a uma família de fatores reguladores da transcrição composta por 9 membros. Todos os membros dessa família apresentam um domínio de ligação ao DNA altamente conservado. Com exceção dos membros *IRF1* e *IRF2*, os outros membros apresentam também um domínio de ligação à proteína (Eroshkin & Mushegian, 1999).

A maior parte dos membros desta família gênica é responsável por respostas à infecção viral pela mediação da transcrição dos interferons, com exceção do *IRF4* que está envolvido no desenvolvimento hematopoiético (Mamane et al., 1999). Alguns estudos identificaram funções adicionais dos IRF como, por exemplo, o *IRF1* parece estar envolvido na inibição do crescimento quando combinado com outros sinalizadores como citocinas e pode ainda agir como pró ou anti apoptose (Kirchoff et al., 1993; Kirchoff et al., 1996; Tanake et al., 1994; Chapman et al., 2000). Os *IRF1* e 2 têm sido relacionados a patogêneses do câncer como supressores tumorais ou oncogenes, respectivamente (Harada et al., 1993; Taniguchi et al., 1997). A função específica de alguns membros da família IRF ainda permanece desconhecida.

A região genômica do *IRF6* abrange aproximadamente 23Kb, a transcrição resulta em um RNAm de 2171pb que produz uma proteína de 467 aminoácidos.

O gene possui 10 éxons, com um conservado domínio de ligação ao DNA nos éxons 3 e 4 e um domínio SMIR/IAD localizado nos éxons 7 e 8 (Kondo et al., 2002). Sua função permanecia desconhecida até que mutações neste gene foram relatadas em casos da síndrome de van der Woude e da síndrome Poplíteo Pterígio (PPS), que é uma síndrome autossômica dominante alélica à VWS. O gene *IRF6* é o primeiro membro da família a mostrar importância no desenvolvimento estrutural (Kondo et al., 2002).

Estudos de expressão com o *IRF6* desenvolvidos tanto com ratos como com tecidos humanos têm mostrado que este gene tem uma alta taxa de expressão nos tecidos da pele humana e palato quando dissecado de embriões de camundongos no período de fusão do palato (cerca de 14,5 a 15 dias da prenhez); esta expressão ocorre na região medial dos folhetos palatais antes e durante a fusão. Foi observado também que o gene apresenta alta taxa de expressão nos tecidos como pele, folículos capilares, dentes molares e genitália externa; todos estes são encontrados como parte do fenótipo das VWS e PPS (Kondo et al., 2002).

Alguns estudos foram desenvolvidos com o objetivo de correlacionar mutações no gene *IRF6* com a etiologia das FL/P-NS (Chakravarti, 2004; Scapoli et al., 2005; Hering & Grundmann 2005; Ghassibe et al., 2005), porém os estudos permanecem controversos; enquanto alguns relatam associação entre o gene *IRF6* e as FL/P-NS, outros relatam a não associação.

***FGFR1* (Receptor do Fator de Crescimento do Fibroblasto 1)**

Os fatores de crescimento de fibroblasto (*FGF1-FGF10* e *FGF16-FGF23*) controlam um amplo espectro de funções biológicas durante o desenvolvimento e

também na vida adulta (Ornitz & Itoh, 2001). As atividades biológicas dos FGF são conduzidas por 7 receptores tirosina-quinase principais codificados por 4 genes (*FGFR1-FGFR4*). Algumas doenças e síndromes são causadas por danos na via de sinalização FGF causadas por mutações incluindo as Craniossinostoses, a Displasia Esquelética (*FGFR1-FGFR3*) e a síndrome de Kallman – KS (*FGFR1*) (Riley et al., 2007). Esta última possui como parte fenótipo anosmia, hipogonadismo hipogonadotrófico e FL/P em aproximadamente 5 a 10% dos casos. Esta síndrome é causada por mutações no gene *FGFR1* (Dode et al., 2003; Dode et al., 2004; Kim et al., 2005)

Modelos animais também dão suporte para o envolvimento dos genes *FGF* e *FGFRs* na etiologia das FL/P, camundongos *knockout Fgf10^{-/-}* (Rice et al., 2004), *Fgfr2b^{-/-}* (De Moerlooze et al., 2000), *Fgf18^{-/-}* (Ohbayashi et al., 2002; Liu et al., 2002) e *Fgf1* hipomórfico possuem FP (Trokovic et al., 2003).

Um total de 25 mutações sem sentido, de sentido trocado, deleções e translocações no gene *FGFR1* já foram encontradas em casos com a síndrome de Kallman (Vermeulen et al., 2002; Dode et al., 2003; Sato et al., 2004; Albuisson et al., 2005; Kim et al., 2005; Pitteloud et al., 2005; Sato et al., 2005). Alguns casos esporádicos de síndrome de Kallman foram relatados com FLP ou FP, destes 9 tiveram mutações identificadas no gene *FGFR1* (Lieblich et al., 1982; White et al., 1983; Tompach e Zeitler, 1995; Molsted et al., 1997; Dode et al., 2003; Albuisson et al., 2005; Jonklaas, 2005; Kim et al., 2005; Zenaty et al., 2006).

Um recente trabalho Riley et al. (2007) relatou a correlação da região cromossômica 8p11-p23 como envolvida na etiologia das FL/P-NS, esta conclusão faz parte de um estudo envolvendo 392 marcadores em todo o genoma em 220 famílias multiplex; os resultados foram positivos para 5 genes

desta região cromossômica mas, o único que tem embasamento anterior para o envolvimento na etiologia das FL/P é o gene *FGFR1*.

FOXE1 (Forkhead Box E1)

O gene *FOXE1* (também chamado de FKHL15/TTF2) pertence a uma grande família de fatores de transcrição caracterizados por seu domínio de ligação ao DNA – o domínio *forkhead*. Análises *in vitro* do mecanismo de ação do *FOXE1* sugerem um papel do *FOXE1* como repressor transcricional (Zannini et al., 1997; Perrone et al., 2000). As proteínas *forkhead* apresentam diversas funções que estão implicadas em uma grande variedade de processos biológicos desde o desenvolvimento embrionário até a regulação do crescimento e proliferação celular em tecidos adultos (Kaufmann & Knochel, 1996; Carlsson & Mahlapuu, 2002), elas estão envolvidas no padrão embrionário de formação (Dathan et al., 2002). A função do gene *FOXE1 (TTF2)* foi primeiramente investigada com relação ao desenvolvimento da tireóide (Zannini et al., 1997; Clifton-Bligh et al., 1998; De Felice et al., 1998; Damante et al., 2001; Castanet et al., 2002). Camundongos com ausência de ambas as cópias do *FOXE1* apresentam hipotireoidismo neonatal ou completa ausência da glândula tireóide e fissura de palato (De Felice et al., 1998). Os genes *forkheads* têm sido identificados como fatores que se ligam a elementos regulatórios de genes expressos em células diferenciadas (Kaestner et al., 1993)

Atualmente, o gene *FOXE1* está implicado em 2 formas sindrômicas da fissura de palato (Clifton-Bligh et al., 1998) e está sob investigação do seu envolvimento na etiologia das FL/P-NS e em disgenesia da tireóide. Embora seja um gene de um único éxon, é um gene de regiões rica em GC, o que causa

grande dificuldade de amplificação da região codificadora inteira para análise (Clifton-Bligh et al., 1998).

Interação gene X gene e gene X ambiente

Obviamente genes e seus produtos não agem isoladamente, eles são componentes de vias nas quais existem várias etapas que precisam ocorrer de maneira correta para que o processo aconteça do modo esperado.

Cada vez mais tem se estudado como os genes podem interagir entre si. Por exemplo, é possível que a combinação de variantes de dois ou mais genes na mesma via resulte em um efeito cumulativo, tanto de maneira benéfica como maléfica. Estudos preliminares indicaram um número possível de interações gene/gene dando força à hipótese de que variações nos genes de uma mesma via podem resultar num efeito combinado ou cumulativo como, por exemplo, no estudo desenvolvido por Shi *et al.* (2005) que investigou os possíveis efeitos genéticos das variações nos genes envolvidos na via de desintoxicação relacionadas ao tabagismo materno.

Genes envolvidos na mediação dos efeitos de exposição externa estão sendo investigados em casos de doenças complexas como as FL/P-NS. A hipótese de que o modo como estes genes interagem pode variar a influência do meio externo tem ganhado força e sido cada vez mais estudada, principalmente em defeitos durante o período do desenvolvimento que podem gerar resultados graves. Um bom exemplo é o tabagismo materno durante a gestação; possíveis interações gene/cigarro têm sido estudadas em diversas populações. Alguns estudos têm mostrado associação entre o tabagismo materno e o alelo raro Taq I do gene *TGFA* e as FL/P e FP (Bailey et al., 1995; Hwang et al., 1995; Shaw et

al., 1996). Alguns estudos com os genes *MSX1* e *TGFB3* mostraram que probandos portadores de variantes nestes genes cujas mães fumaram durante a gestação apresentam um elevado risco para FL/P (Romitti et al., 1999). Shi et al. (2005) relataram que existe um risco elevado para FL/P para crianças que possuem deleção para ambas as cópias do gene *GSTT1*, um gene da via de desintoxicação, e cujas mães fumaram durante a gestação, sendo esse risco crescente de acordo com o maior número de cigarros consumidos por dia; esse aumento no risco não foi encontrado em casos que não tiveram a exposição.

Com base em toda a complexidade envolvida na etiologia das FL/P-NS estimou-se que em famílias com 2 ou mais indivíduos afetados em gerações consecutivas pode-se levantar a hipótese de que mutações em genes únicos seriam encontradas mais frequentemente do que em famílias em que as FL/P aparecem como fenômeno isolado. Para explorar esta hipótese mais detalhadamente, foi realizado um estudo de associação de marcadores dos genes *MSX1*, *TGFB3* e *MTHFR* em um grupo amostral de 60 famílias brasileiras com recorrência (Silva et al., 2006). Não foi encontrada associação dos genes *MSX1* e *TGFB3*, porém, os resultados foram sugestivos para o gene *MTHFR* e para o marcador CA no gene *MSX1* houve uma sugestão de associação positiva somente no subgrupo dos pais afetados.

O presente trabalho é uma continuidade do projeto anterior, e visou ampliar o número de famílias com recorrência para um número jamais publicado na literatura e analisar um grupo maior de genes candidatos explorando a hipótese apresentada. As análises feitas neste trabalho foram realizadas no laboratório do Dr Jeffrey Murray, na Universidade de Iowa, Iowa City, IA, EUA.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Realizar estudo de associação e sequenciamento direto de genes candidatos para fissura labial e/ou palatal não sindrômica em uma amostra de famílias brasileiras com recorrência.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar o estudo de associação dos genes *IRF6*, *TGFA*, *MSX1*, *FGFR1*, *FOXE1*, *BMP4* e *TGFB3*, com FL/P-NS.
- Realizar o sequenciamento dos genes *IRF6*, *MSX1* e *BMP4* na amostra selecionada.

3. ARTIGO CIENTÍFICO – versão em português

Famílias com indivíduos portadores de fissura de lábio e palato em 2 gerações consecutivas não mostram forte associação com genes candidatos.

A.L. Silva^{1,2}, L.A. Ribeiro², M.E. Cooper³, M.L. Marazita³, D. Moretti-Ferreira¹, J.C. Murray⁴.

1) Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brazil;

2) Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, USP, Bauru, SP, Brasil;

3) Center for Craniofacial and Dental Genetics, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA;

4) Pediatrics, University of Iowa, Iowa City, IA

Resumo

Tanto fatores genéticos como ambientais contribuem com a etiologia das fissuras de lábio e/ou palato (FL/P). Vários genes candidatos têm sido estudados e revelaram mutações ou associação com a forma não sindrômicas das FL/P (FL/P-NS). Em famílias com 2 ou mais indivíduos afetados em gerações consecutivas pode-se levantar a hipótese de que mutações em genes únicos serão encontradas mais frequentemente do que em famílias em que as FL/P aparecem como fenômeno isolado. Para explorar esta hipótese mais detalhadamente, desenvolvemos estudos de desequilíbrio de ligação e testes de associação com 7 genes candidatos (IRF6, TGFA, MSX1, FGFR1, FOXE1, BMP4 e TGFB3) bem como sequenciamento direto em 3 destes, os quais já foram publicados como portadores de mutações causadoras de fissuras orais. Esses últimos são: IRF6, MSX1 e BMP4. Apenas 2 mutações foram identificados em um

painel de aproximadamente 180 famílias as quais podem ser consideradas etiológicas. Além disso, testes de associação o TDT (Transmission Disequilibrium Test) não mostraram resultados de substancial impacto para as SNPs analisadas. Quando as famílias foram divididas em subgrupos de genitores afetados, observamos uma sugestão de associação com o gene TGFB3. Concluimos que no geral, mutações em um único gene não são a causa principal das FL/P-NS mesmo nas famílias com 2 ou mais gerações consecutivas como as estudadas neste trabalho. Isso reforça a complexidade da etiologia das FL/P-NS e a necessidade de esforços adicionais nos estudos de interações gene-gene e gene-ambiente mesmo que naquelas famílias que parecem fornecer fortes componentes genéticos.

Introdução

As fissuras orais são um defeito congênito comum, facilmente reconhecível e resultam da falha de fusão do lábio e palato durante o desenvolvimento embrionário. Fissuras de lábio podem ser observadas como fenômenos uni ou bilaterais, isoladas ou acompanhadas por fissura do palato; a fissura de palato também pode ser observada como um fenômeno isolado e pode ser parcial ou completa. Todos esses tipos citados são comumente referidos como fissuras orais.

Estudos sugerem que aproximadamente 70% dos casos de fissura de lábio e/ou palato (FL/P) e 50% dos casos de FP são não sindrômicos (NS), ou seja, não estão associados a qualquer outra anomalia física e/ou de desenvolvimento (Milerad et al., 1997; Saal, 1998, 2000; Tolarova & Cervenka, 1998; Stoll et al., 2000). Os casos sindrômicos podem ser subdivididos entre as

mais de 400 síndromes mendelianas conhecidas (Online Mendelian Inheritance in Man: <http://www.ncbi.nlm.gov/omim>), síndromes de herança não caracterizada e aqueles resultantes de ação teratogênica. As FL/P-NS ocorrem numa incidência de aproximadamente 1/700 nascidos vivos variando de acordo com a origem geográfica (Vanderas, 1987) e status socioeconômico (Murray et al., 1997). As causas das FL/P-NS são complexas, envolvendo tanto fatores genéticos como ambientais, caracterizando a herança multifatorial. Este fato proporciona amplas oportunidades para identificar genes candidatos, explorar interações gene-ambiente e aprender mais sobre embriologia humana e seus distúrbios (Murray, 2002).

Fogh-Andersen (Fogh-Andersen, 1942) foi o primeiro a relatar os fatores genéticos das FL/P, os quais foram confirmados por análise de segregação (Marazita et al., 1986). Tem sido sugerido que de 3 a 14 genes, interagindo multiplicativamente, podem estar envolvidos na etiologia das FL/P (Schliekelman and Slatkin, 2002). Avanços nas análises quantitativas e moleculares fazem dos estudos de ligação e associação boas ferramentas para os estudos da etiologia das FL/P (Mitchell et al., 2002). Modelos animais também são bons métodos de estudo para localizar loci e genes candidatos para serem posteriormente estudados em humanos e podem ser também estudadas as interações gene-gene e gene ambiente.

Vários estudos recentes têm relatado fortes evidências de que as formas sindrômicas das FL/P podem oferecer um entendimento da etiologia da forma não sindrômica das FL/P (FL/P-NS). Algumas formas sindrômicas das fissuras com genes causadores conhecidos podem ser confundidas as formas não sindrômicas das FL/P, como por exemplo, a síndrome de Van der Woude e o

gene IRF6 na qual as fístulas do lábio inferior estão ausentes. (Kondo et al., 2002). Outros exemplos são: síndrome EEC (Ectrodactyly, Ectodermal Dysplasia) e mutações no gene p63 (Celli et al., 1999), síndrome Margarita Island ectodermal dysplasia (Sözen et al., 2001), ankyloglossia ligada ao X e fissura de palato (Braybrook et al., 2001), *FGFR1* (Kallmann syndrome) (Dode et al., 2003), e o gene *MSX1* no qual mutações levam a fissura (van den Boogard et al., 2000), hipodontia seletiva (Vastardis et al., 1996) ou anomalias dentárias associadas a problemas ectodérmicos (Jumlongras et al., 2001) são encontrados com mutações codificadoras específicas.

Outros genes candidatos para as FL/P-NS vêm de estudos com humanos ou modelos animais, utilizando-se particularmente os camundongos knockouts e expressão gênica. Vieira et al. (2005) relatou os resultados do sequenciamento direto de 20 genes diferentes em 180 casos de FL/P-NS; das 256 variantes observadas, 16 mutações de sentido trocado foram identificadas em 9 genes (*FOXE1*, *GLI2*, *JAG2*, *LHX8*, *MSX2*, *SATB2*, *SKI*, *SPRY1*, *SPRY* e *TBX10*) e mostraram ter potencial importância etiológica. Watanabe et al (2006) relatou uma mutação de sentido trocado no gene *RYK* que parece desempenhar papel no desenvolvimento das FL/P-NS.

Tanto fatores genéticos como ambientais contribuem para a etiologia das fissuras de lábio e/ou palato (FL/P). Estudos com genes candidatos têm revelado mutações ou associação com a forma não sindrômicas das FL/P (FL/P-NS). Em famílias com 2 ou mais indivíduos afetados em gerações consecutivas pode-se levantar a hipótese de que mutações em genes únicos seriam encontradas mais frequentemente do que em famílias em que as FL/P aparecem como fenômeno isolado. Para explorar esta hipótese mais detalhadamente, analisamos um total

de 176 famílias com recorrência materna e paterna de FL/P-NS através de estudos de desequilíbrio de ligação e testes de associação com 7 genes candidatos (*IRF6*, *TGFA*, *MSX1*, *FGFR1*, *FOXE1*, *BMP4* e *TGFB3*), bem como sequenciamento direto de 4 dos genes citados acima: *IRF6*, *MSX1*, *BMP4* e *FOXE1*, os quais já foram publicados mutações causadoras de fissuras orais.

Material e Métodos

Pacientes

Foram analisadas 176 famílias, cada uma incluindo uma criança afetada e pelo menos um dos pais também afetado (figura 5) previamente avaliadas no setor de Genética do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – Centrinho – USP/Bauru e com recorrência familiar de fissuras de lábio e/ou palato isoladas. Os casos de fissuras sindrômicas foram excluídos desse trabalho. A seleção das famílias e do histórico familiar foi realizada através de análise de prontuários. Para a realização deste estudo foram coletados 3ml de sangue periférico de cada paciente e seus pais com anti-coagulante EDTA 6%. Todas as amostras foram obtidas mediante consentimento informado e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do HRAC-USP – Bauru (Anexo 1) e pelo CONEP (Anexo 2)

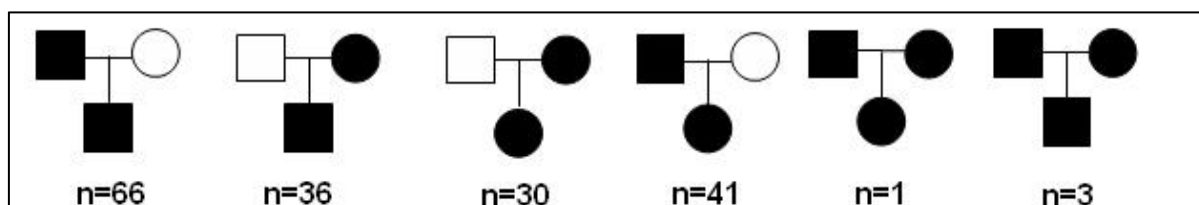


Figura 1: tipos e número de famílias presentes neste estudo.

As 176 famílias analisadas incluíram 97 famílias com recorrência paterna, 75 famílias com recorrência materna e 5 famílias com recorrência paterna e materna.

Grupo Controle

O grupo controle para este estudo foi formado por 294 amostras de DNA de recém nascidos não afetados e suas mães também normais e sem histórico familiar de FL/P. As amostras utilizadas foram previamente obtidas para o projeto “Fatores ambientais, polimorfismo C677T no gene MTHFR: Interação gene-ambiente na etiologia da fissura de lábio com ou sem fissura de palato não-sindrômica”, projeto este já aprovado pelo Comitê de Ética do HRAC-USP-Bauru e pelo CONEP – Brasília. Para que este grupo controle pudesse ser incluído neste projeto o termo de consentimento livre e esclarecido foi enviado à todas as famílias via correio juntamente com uma carta explicativa sobre o estudo a ser desenvolvido e a importância de um grupo controle. Os termos de consentimento assinado pelas famílias foram enviados de volta via correio totalizando um número de 294 indivíduos disponíveis para as análises.

Obtenção do DNA genômico

O DNA foi extraído a partir do sangue periférico com o kit comercial de extração PureGene DNA purification kit (Gentra) seguindo as instruções do fabricante. Todas as amostras de DNA foram quantificadas e qualificadas através de leitura em espectrofotômetro ESPECTRONIC® GENESYS 5.

Genotipagem

A determinação do genótipo com relação aos SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) foi realizada de acordo com um protocolo padrão no sistema de detecção automática de seqüência (ABI Prism 7900HT, Applied Biosystems), utilizando a análise TaqMan (Applied Biosystems). Os SNPs foram escolhidos utilizando-se o site do HapMap (<http://www.hapmap.org/index.html>) ou baseando-se em estudos prévios do nosso grupo. Os SNPs analisados neste projeto estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1: genes e SNPs analisados neste estudo.

		GENES					
	IRF6	TGFB3	FGFR1	TGFA	FOXE1	MSX1	BMP4
SNPs	rs2235371(V274I)	rs3917210	rs10958704	rs454305	rs894673	rs12352	rs17563
	rs4844880	rs3917101	rs13317	rs3732253	rs3758249	rs4075	rs2761884
	rs2013162	rs2284792	rs6996321	rs2902345	rs874004		
	rs126280	rs2268626	rs881301				
	rs223577	rs11159161					
	rs181019	rs11159163					
	rs17015224						

Para detectar o polimorfismo de repetição CA no gene *MSX1* foi realizada a técnica de análise SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism) em gel MDE (*Mutation Detection Enhancement*). O produto amplificado por PCR foi submetido a eletroforese em gel não desnaturante MDE por 5 a 6 horas a 20 W em temperatura ambiente com a utilização de ventiladores. Foram analisados também DNA controles com genótipo previamente conhecidos. Os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com protocolo previamente publicado (Budwole et al., 1991).

Métodos de análise estatística

Analisamos a herança de cada marcador em todas as famílias usando o programa PedChek para verificar inconsistência devido a não paternidade ou erros mendelianos.

As análises estatísticas foram desenvolvidas dentro do padrão do teste de desequilíbrio de transmissão (TDT). Os alelos de cada marcador foram testados para associação com as FL/P. O programa FBAT (Family Based Association Test) foi utilizado nas análises de TDT no grupo total de famílias, no qual o TDT bialélico comparou cada alelos *versus* todos os outros e o modo multialélico testou a distribuição de todos os alelos simultaneamente.

Para a análise parental-específica foi utilizado o programa S.A.G.E. (Statistical analysis for genetic epidemiology), v 5.1. O grupo total de famílias foi analisado, bem como 2 subgrupos: (1) subgrupo de famílias com recorrência materna e (2) subgrupo de famílias com recorrência paterna.

Contrariamente ao S.A.G.E., o FBAT não distingue a transmissão paterna da materna e sim se utiliza da informação de ambos os genitores em conjunto.

Avaliamos também a interação gene X gene usando os SNPs que apresentaram associação positiva ou limítrofe. No caso de SNPs com valores de associação positivos obtivemos o *score* FBAT Z por família para cada heredograma para cada SNP. Enquanto, utilizando-se de SAS, fizemos a correlação e regressão logística dos pares de SNPs. Adicionalmente, fizemos a inferência sobre quando a análise gene-gene indica interação (2 genes agindo juntamente) ou heterogeneidade (2 genes agindo independentemente). Essa determinação é feita observando-se quando o sinal de coeficiente de correlação (ou regressão estimada) é positiva ou negativa entre cada um dos alelos das 2

SNPs analisadas. A correlação positiva entre 2 alelos super transmitidos é interpretada como correlação, enquanto que a negativa é considerada heterogeneidade.

Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento de todos os éxons dos genes candidatos *IRF6*, *MSX1*, *BMP4* e *FOXE1*. A amplificação para o sequenciamento foi obtida através de PCR (Polymerase Chain reaction) em termociclador Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cada reação de 10 µL continha 1.5 mM Mg²⁺, 200 mM dNTPs, 0.3 mM de cada primer iniciador, e 0.25 unidades de tampão Bioexact ou Biolase (Bioline USA, Inc., Randolph, MA) e 20 ng a 40 ng de DNA. As condições da PCR foram variadas de acordo com os *primers* utilizados. O sequenciamento foi realizado com o Kit de sequenciamento Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cada reação de sequenciamento de 10 µL continha Big Dye Terminator Mix, Tampão Big Dye Terminator, 0,075 mM de *primers* iniciadorEs correspondente, 1.25 ng por 100 pb de produto da PCR, e 5% de DMSO e foram realizados pelo menos 40 ciclos.

As reações de sequenciamento foram processadas no seqüenciador automático ABI Prism 3700 analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) e analisadas pelo programa Polyphred 4.0 (<http://droog.mbt.washington.edu/polypdoc40.html>) e Consed (<http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysistools/consed.cfm>) e foram ainda conferidas manualmente para verificar diferenças e possíveis resultados falso-positivo ou falso-negativo. Os *primers* iniciadores utilizados foram

desenhados utilizando-se o website Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Todos os *primers* utilizados bem como as condições das reações de PCR e seqüenciamento estão listados na Tabela 2.

Teste de associação (TDT)

O TDT foi realizado no grupo total de famílias e também em subgrupo definidos de acordo com: 1- *status* de afecção do genitor (transmissão do genitor afetado X transmissão do genitor não afetado); 2- tipo de fissura apresentada nas

famílias (famílias com FL, famílias com FLP e famílias com ambas FL e FLP); 3-sexo do genitor afetado (transmissão das mães afetadas X transmissão dos pais afetados).

Para o grupo total de famílias, encontramos associação com marcadores nos genes *IRF6* ($p=0,02$), *MSX1* ($p=0,01$) e *TGFB3* ($p= 0,04$ e $0,006$). Quando analisamos os subgrupos baseado no tipo de fissura das famílias encontramos associação com o gene *TGFB3* ($p=0,007$) para as famílias portadoras de FL e também para as famílias portadoras de FL/P ($p=0,007$) separadamente. Para as famílias que apresentam ambas FL e FL/P encontramos associação com os genes *MSX1* ($p=0,01$) e *TGFA* ($p=0,02$), sendo que este último não foi associado a nenhum outro subgrupo analisado. Os dados estão mostrados na Tabela 3.

Foi analisado também o subgrupo baseado no *status* de afecção dos genitores usando o programa S.A.G.E. que realiza um TDT parental-específico, ou seja, diferencia a transmissão paterna versus a transmissão materna e compara com o grupo total. A Tabela 4 mostra que encontramos associação do grupo total com os genes *IRF6* ($p=0,02$), *MSX1* ($p=0,01$) e *TGFB3* ($p=0,03$ e $0,006$) e quando comparamos com o grupo de acordo com o *status* de afecção dos genitores vimos que a associação foi mantida pelo gene *MSX1* e *TGFB3*. Curiosamente, o marcador *MSX1-CA* que não tinha apresentado associação com o grupo total, mostrou um resultado significativo para o grupo de genitores afetados ($p=0,03$) o que se tornou ainda mais significativo após a combinação deste grupo com as famílias portadoras de FLP. Os outros marcadores utilizados para o gene *MSX1* mostraram resultados mais significativos no grupo de famílias portadoras de ambas as FL e FLP.

Quando analisamos a transmissão dos alelos baseada no sexo do genitor afetado, encontramos associação com os genes *MSX1* ($p=0,03$) e *TGFB3* ($p=0,005$) apenas para a transmissão a partir de mães afetadas (Tabela 5). O grupo de pais afetados revelou apenas uma sugestão de associação ($p=0,06$) para o gene *IRF6* (dados não mostrados).

Tabela3: TDT (FBAT) resultados significativos para o grupo total e subgrupos

Marcador	Alelo	afreq	fam#	O	E(S)	Var(S)	Z	P
TOTAL N=167								
IRF6SNP9	1	0,947	20	35	30	5	2,236	0,025347
IRF6SNP9	2	0,053	20	5	10	5	-2,24	0,025347
MSX1rs12532	1	0,605	83	86	98,5	28,25	-2,35	0,018683
MSX1rs12532	2	0,395	83	86	73,5	28,25	2,352	0,018683
TGFB3rs11159161	1	0,473	78	93	83	25,5	1,98	0,04767
TGFB3rs11159161	2	0,527	78	69	79	25,5	-1,98	0,04767
TGFB3rs11159163	1	0,363	79	52	66	26,5	-2,72	0,006536
TGFB3rs11159163	2	0,637	79	110	96	26,5	2,72	0,006536
FL N=25								
TGFB3rs11159161	1	0,537	14	20	14,5	4,25	2,668	0,007633
TGFB3rs11159161	2	0,463	14	8	13,5	4,25	-2,67	0,007633
FLP N=79								
TGFB3rs11159163	1	0,37	36	23	31	12,5	-2,26	0,023652
TGFB3rs11159163	2	0,63	36	49	41	12,5	2,263	0,023652
FL/FLP N=59								
TGFARS454305	1	0,595	26	37	30,5	8,25	2,263	0,023635
TGFARS454305	2	0,405	26	17	23,5	8,25	-2,26	0,023635
MSX1rs12532	1	0,623	34	36	44,5	12,25	-2,43	0,015158
MSX1rs12532	2	0,377	34	38	29,5	12,25	2,429	0,015158

as linhas cinzas destacam o alelo super transmitido para cada marcador; $p < 0,05$; afreq=freqüência do alelo; fam#=número de famílias informativas; O=observado; E=esperado; Var=variância; Z=valor Z; P=p-valor; N=número total de famílias (este número é de 167 famílias e não de 176 como o coletado devido a amostras de má qualidade que não puderam ser amplificadas e analisadas).

Tabela4: S.A.G.E. análise de transmissão parental-específica

MARCADORES	TOTAL	Transmissão do genitor afetado	Transmissão do genitor não afetado	# famílias informativas
TOTAL N=167				
IRF6SNP9	0,02	0,69	0,02	20
MSX1rs12532	0,01	0,05	0,15	81
MSX1CA	0,18	0,03	0,11	95
TGFB3rs11159161	0,03	0,08	0,24	83
TGFB3rs11159163	0,006	0,15	0,02	80
FL N=25				
TGFB3rs11159161	0,007	0,12	0,07	16
FLP N=79				
IRF6SNP12		0,08	0,14	20
MSX1CA	0,27	0,008	0,57	38
TGFB3rs11159163	0,01	0,21	0,04	33
FL/FLP N=59				
MSX1rs4075	0,34	0,06	0,51	28
MSX1rs12532	0,006	0,03	0,14	31

São mostrados apenas os marcadores com resultados significativos; $p \leq 0,05$

Tabela5: Famílias com mães afetadas

marcador	alelo	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P
TOTAL N=77								
TGFB3rs3917210	1	0,818	20	36	29	6,5	2,746	0,00604
TGFB3rs3917210	2	0,182	20	8	15	6,5	-2,746	0,00604
TGFB3rs11159163	1	0,374	31	20	29,5	11,75	-2,771	0,005581
TGFB3rs11159163	2	0,626	31	46	36,5	11,75	2,771	0,005581
MSX1rs12532	1	0,603	35	37	44,5	12,25	-2,143	0,032125
MSX1rs12532	2	0,397	35	39	31,5	12,25	2,143	0,032125
FL+FLP=32								
TGFB3rs11159163	1	0,324	14	7	12,5	5,25	-2,4	0,016377
TGFB3rs11159163	2	0,676	14	25	19,5	5,25	2,4	0,016377
MSX1rs12532	1	0,632	16	19	24	6	-2,041	0,041227
MSX1rs12532	2	0,368	16	19	14	6	2,041	0,041227

as linhas cinzas destacam o alelo super transmitido para cada marcador; $p < 0,05$; afreq=frequência do alelo; fam#=número de famílias informativas; O=observado; E=esperado; Var=variância; Z=valor Z; P=p-valor; N=numero total de famílias.

Sequenciamento

Foram sequenciados todos os éxons dos genes *IRF6*, *MSX1*, *BMP4* e *FOXE1* em todos os probandos e alguns éxons selecionados nos genitores

(quando uma variante foi encontrada no probando, procedeu-se a análise do mesmo éxon nos genitores). A Tabela 6 resume os resultados do sequenciamento direto. O sequenciamento do gene *IRF6* revelou 6 SNPs comuns e conhecidas em regiões não codificadoras e uma nova mutação na região 3'UTR após o éxon 9, além de 5 mutações sinônimas que foram também encontradas na população controle. Para o gene *MSX1*, observamos 8 SNPs comuns e conhecidas em regiões não codificadoras, incluindo a deleção de 11 pares de base relatada por Jezewski et al. (2003), duas mutações sinônimas e três não sinônimas. Destas últimas, uma foi encontrada na mãe afetada, mas o probando não apresenta a mutação e as duas outras foram encontradas também na população controle. Esse caso foi o único em que o estudo iniciou-se a partir da mãe afetada, pois o DNA da criança foi obtido posteriormente.

No gene *BMP4*, observamos três SNPs intrônicas comuns e conhecidas e uma nova mutação no íntron 3 presente tanto em um probando quanto em sua mãe afetada. Observamos também SNPs comuns em regiões codificadoras e duas novas variantes: uma mutação sinônima e uma nova mutação na região 3'UTR 88 pb após o códon de finalização, porém esta foi também encontrada em nossa população controle.

No gene *FOXE1*, foi observado a presença de alguns SNPs conhecidos e também a presença de 2 mutações não sinônimas novas: G37R e P190R. A primeira foi encontrada em uma probanda afetada com FLP cuja mãe também é afetada, porém, os pais não estavam disponíveis para análise. A mutação P190R foi encontrada em 5 pacientes e em um dos genitores. Estas 2 mutações não foram encontradas na população controle analisada.

Realizamos análises das mutações encontradas nos websites ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) para avaliar a possibilidade de alterações nos sítios de *splicing* e Polyphen (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>) para checar possíveis danos na proteína causados pelas mutações não sinônimas. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: resultados do sequenciamento, variantes e mutações encontradas					
Gene	Localização	Tipo	Alteração de AA	Polyphen	ESE finder
IRF6	Intron1(rs2235377)	não codificante	-	-	-
	Intron3 (rs7552506)	não codificante	-	-	-
	Intron4 (rs17015224)	não codificante	-	-	-
	Intron6 (rs2235375)	não codificante	-	-	-
	Intron7 (rs2235373)	não codificante	-	-	-
	Exon2 (rs861019)	não codificante	-	-	-
	Exon5 (rs34907424)	sinônima	G130G	-	elimina 1 sítio de ligação
	Exon5 (rs2013162)	sinônima	S153S	-	elimina 2 sítios de ligação
	Exon7 (rs2235371)	não-sinônima	V274I	benigna	elimina 1 sítio de ligação
	Exon8	sinônima	L385L	-	cria 2 sítios de ligação
	Exon9	sinônima	K437K	-	elimina 1 sítio de ligação
	Exon9 (UTR)	não codificante	-	-	-
MSX1	Intron1 (11 bp deletion)*	não codificante	-	-	-
	Intron1 (rs7660910)	não codificante	-	-	-
	Intron1 (rs3111690)	não codificante	-	-	-
	Intron1 (rs10213148)	não codificante	-	-	-
	Intron1 (rs10000804)	não codificante	-	-	-
	Intron1 (rs36946149)	não codificante	-	-	-
	Intron1 (rs1042484)	não codificante	-	-	-
	Intron1 (rs35871751)	não codificante	-	-	-
	Exon1	não-sinônima	A23V	benigna	elimina 1 sítio de ligação
	Exon1	não-sinônima	A34G	benigna	cria 3 sítios de ligação elimina 1 sítio de ligação
	Exon1	não-sinônima	P67L	possível dano	elimina 1 sítio de ligação
Exon1	sinônima	G110G	-	elimina 1 sítio de ligação	
Exon1	sinônima	K116K	-	elimina 2 sítios de ligação	
BMP4	Intron2 (rs2761880)	não codificante	-	-	-
	Intron2 (rs35107139)	não codificante	-	-	-
	Intron3 (nova)	não codificante	-	-	-
	Intron3 (rs2071047)	não codificante	-	-	-
	Exon3 (nova)	sinônima	L26L	-	cria 1 sítio de ligação
	Exon4 (rs17563)	não-sinônima	A152V	benigna	-
	Exon4 (nova)	não codificante	-	-	-
FOXE1	Exon1 (rs1867277)	não codificante	-	-	-
	Exon1 (rs1867278)	não codificante	-	-	-
	Exon1 (rs1867279)	não codificante	-	-	-
	Exon1 (rs1867280)	não codificante	-	-	-
	Exon1	sinônima	A29A	-	-
	Exon1	não-sinônima	G37R	benigna	elimina 2 sítios de ligação
	Exon1 (rs3021523)	sinônima	L129L	-	-
	Exon1	não-sinônima	P190R	provável dano	cria 2 sítios de ligação
Exon1 (rs3021526)	sinônima	S275S	-	-	

*deleção de 11 pb descrita por Jezewski et al.(2003)

Discussão e Conclusão

Um dos grandes desafios em estudar doenças complexas, tais como as FL/P-NS, é que um grande número de genes e fatores ambientais está envolvido na etiologia, o que torna as investigações mais demoradas e complexas. Pode-se presumir que a seleção de famílias com 2 ou mais indivíduos afetados em duas ou mais gerações consecutivas envolvidas possa facilitar a detecção de fortes fatores genéticos em vários genes e até mesmo em um único gene que seja o causador da anomalia, devido à maior contribuição genética.

Muitos genes têm sido estudados nos quais mutações sem sentido ou de sentido trocado podem resultar em uma alta penetrância em casos de FL/P baseados em mutações em um único gene: *MSX1* (van der Boogaard et al., 2000), *FGFR1* (Dode et al., 2003), *TBX22* (Marçano et al., 2004) e outros possíveis genes com mutações pontuais como demonstrado por Vieira et al. (2005); Watanabe et al. (2006); Warrington et al. (2006).

O estudo de famílias com recorrência, como as analisadas neste trabalho, poderia determinar como mutações comuns em genes candidatos poderiam ser identificados, demonstrando a transmissão genitor – probando e subsequentemente estudar os impactos do aconselhamento genético. Neste trabalho foram analisados 7 genes candidatos (*IRF6*, *TGFA*, *MSX1*, *FGFR1*, *FOXE1*, *BMP4* e *TGFB3*) utilizando ambos os estudo de associação através de SNPs conhecidas e sequenciamento direto das regiões codificadoras e reguladoras dos genes.

No geral, neste trabalho foram encontradas sugestões de associação em diferentes comparações, principalmente com os genes *IRF6*, *MSX1* e *TGFB3*. Estes genes já foram previamente relatados como envolvidos na etiologia das

FL/P-NS e são considerados fortes genes candidatos (Beaty et al., 2001; Blanco et al., 2001; Beaty et al., 2002; Jugessur et al., 2003; Kim et al., 2003; Zucchero et al., 2004; Scapoli et al., 2005; Hering & Grundmann 2005; Ghassibe et al., 2005; Ichikawa et al., 2006). Em trabalho anterior feito por nosso grupo (Silva et al., 2006) o gene MSX1 apresentou associação com as FL/P-NS quando analisado o subgrupo de transmissão de genitores masculinos (pai) afetados para os probandos (filho/a) em um número de 36 trios. No presente estudo, o grupo amostral de trios com ocorrência paterna de fissura foi ampliado para 107 e a associação vista anteriormente não foi confirmada.

Com relação ao sequenciamento direto, foi identificado um pequeno número de mutações com potencial interesse, porém nenhuma delas poderia ser diretamente responsabilizada pela etiologia das FL/P-NS. As 2 principais mutações não sinônimas encontradas foram a P167L no gene MSX1 e a P190R no gene FOXE1. A primeira está presente na mãe afetada, porém não está presente no probando e a segunda foi encontrada em 4 probandos e em 3 mães não afetadas e em 1 pai afetado.

A presença de mutações como as encontradas neste estudo tanto em probandos quanto em alguns genitores não afetados reforça a idéia de etiologia poligênica de que a interação de mutações distintas seria a causa principal das FL/P-NS. Uma outra possibilidade que pode ser levantada é a de que essas mutações agem como um fator modificador ou de predisposição e que sua presença possa alterar alguma via metabólica durante o desenvolvimento embrionário, o que levou ao surgimento da fissura.

Em conclusão, de acordo com os objetivos deste estudo, apresentamos os resultados das análises de associação e sequenciamento que parecem rejeitar a

hipótese de que mutações em um único gene possam ser responsáveis pela etiologia das FL/P-NS mesmo quando encontradas em famílias com afetados em gerações consecutivas, porém, o estudo reforça a necessidade de esforços adicionais em estudos de análises interação gênica até mesmo nas famílias que pareçam fornecer componentes genéticos fortes como os casos das famílias com recorrência.

Agradecimentos

Primeiramente gostaríamos de agradecer a todas as famílias que participaram deste estudo. Gostaríamos de agradecer também a Adela Mansilla e Marla Johnson pela ajuda técnica. Este projeto recebeu apoio financeiro do CNPq, NIH Grant DE08559 e da Fundação Lucentis de Apoio à Cultura, Ensino, Pesquisa e Extensão.

4. ARTIGO CIENTÍFICO – versão em inglês

Two generation families with isolated Cleft lip and/or palate fail to show strong correlations with candidate genes

A.L. Silva^{1,2}, L.A. Ribeiro², M.E. Cooper³, M.L. Marazita³, D. Moretti-Ferreira¹, J.C. Murray⁴.

1) Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brazil;

2) Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, USP, Bauru, SP, Brazil; 3) Center for Craniofacial and Dental Genetics, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA;

4) Pediatrics, University of Iowa, Iowa City, IA

Abstract

Both genetic and environmental triggers are recognized as contributing to the etiology of clefts of the lip and/or palate. A handful of candidate genes have shown either mutations or associations with isolated forms of clefts. In families in which two generations or more of individuals are affected with clefting, it could be hypothesized that single gene contributions might be more frequent than in families in which the cleft appears as an isolated phenomenon. To explore this hypothesis in more detail, we carried out linkage disequilibrium, association tests, as well as direct sequencing of three strong candidate genes which have previously been shown to play a role in some forms of clefting. These genes included IRF6, MSX1, BMP4 and FOXE1. Only two mutations were identified in a screen of approximately 180 families with two generations of affected individuals that might be considered etiologic. In addition, tests of association using transmission disequilibrium testing on the families failed to show substantial

significance for single gene SNP interactions. When the families were segregated by looking at affects contributed to by the affected parent only, there were weak effects observed with TGF β -3.

In the aggregate, the single gene contribution doesn't seem to be the major cause of nonsyndromic clefts in families with two generations or more of individuals which reinforces the need for additional efforts to look at gene-by-gene interactions even in those families which appear to have the strongest underlying genetic components.

Introduction

Craniofacial anomalies, and in particular cleft lip and palate, are major human birth defects with substantial clinical impact. They require surgical, nutritional, dental, speech, medical and behavioral interventions and impose a major economic burden (Strauss, 1999). Studies suggest that about 70% of cases of cleft lip and palate (CL/P) and 50% of cleft palate (CP) are nonsyndromic (NS), and defined as not associated with any other physical or development anomalies (Milerad et al., 1997; Saal, 1998, 2000; Tolarova e Cervenka, 1998; Stoll et al., 2000). Nonsyndromic clefts have an incidence about 1/700 births with wide variability related to geographic origin (Vanderas, 1987) and socioeconomic status (Murray et al., 1997) and have a complex etiology involving both genetics and environmental factors what affords ample opportunities to identify genes and gene–environment interactions and to learn more about human embryology and its disturbances (Spritz, 2001).

Fogh-Andersen (Fogh-Andersen, 1942) first defined genetic factors in clefting, which have been confirmed by segregation analysis (Marazita et al., 1986). It has been suggested that from 3 to 14 genes, interacting multiplicatively, may be involved in the etiology of CL/P (Schliekelman and Slatkin, 2002). Advances in both quantitative and molecular analysis make linkage and association approaches to CL/P etiology practical (Mitchell et al., 2002). Animal models can also provide genes and loci for studies in humans and can be used to look at gene–gene and gene–environment interaction.

Several recent studies have provided strong evidence that syndromic forms of clefting may provide insights into genetic etiologies in nonsyndromic forms. Examples of genes causing syndromic forms of clefting in which nonsyndromic forms might be masked include the Van der Woude syndrome and the IRF6 gene when lip pits are absent (Kondo et al., 2002), EEC syndrome and P63 gene mutations (Celli et al., 1999), Margarita Island ectodermal dysplasia syndrome (Sözen et al., 2001), X linked ankyloglossia and cleft palate (Braybrook et al., 2001), *FGFR1* (Kallmann syndrome) (Dode et al., 2003), and the *MSX1* gene in which clefting (van den Boogard et al., 2000) selective hypodontia (Vastardis et al., 1996) or dental anomalies associated with other ectodermal features (Jumlongras et al., 2001) are found with specific coding sequence mutations.

Other genes as candidates for NS-CL/P have come from studies with humans or animal models using particularly mouse knockouts and gene expression. Vieira et al. (2005) reported the results of sequencing 20 different genes in 180 CL/P cases, of the 256 variants seen, 16 missense mutations in nine genes (*FOXE1*, *GLI2*, *JAG2*, *LHX8*, *MSX2*, *SATB2*, *SKI*, *SPRY1*, *SPRY* and *TBX10*) seemed to be of potential etiologic importance. Watanabe et al (2006)

reported a missense mutation on the RYK gene that likely plays a role in the development of NS-CL/P.

Our study design involves a screening of candidate genes in family-based tests of association. We analyzed a total of 27 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 7 strong candidates the genes for NS-CL/P: IRF6 (7), TGFA (3), MSX1 (2), FGFR1 (4), FOXE1 (3), BMP4 (2) and TGFB3 (6), and 1 intronic marker at the MSX1 gene (MSX1-CA). The analysis was focused on families with both a parent and an offspring affected. We used the transmission/disequilibrium test (TDT) which follows the transmission of alleles from parents who are heterozygous at that locus (Spielman et al., 1993). In a random situation, there would be a 50:50 chance that a given allele would be transmitted and the TDT looks for significant deviations from this expected ratio. In an association situation it is observed an over transmission of one of the alleles of the studied markers. Using families with both a parent and an offspring affected we can follow the transmission of the alleles looking for an over transmission that may come from the affected parent to affected child. We also performed direct sequencing in 4 of these candidate genes IRF6, MSX1, BMP4 and FOXE1.

Methods

Subjects

A total of 176 families, each one including an affected child and at least one affected parent, were studied (fig 1). Families were ascertained at the Hospital for

Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, in Bauru, SP, Brazil. All triads were examined by a clinical geneticist to confirm that they were nonsyndromic. In addition to the information about family history and personal and medical history, parents provided blood samples. Informed consent was obtained from all adult subjects and legal guardians of underage patients. DNA was extracted from peripheral blood samples using a Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA).

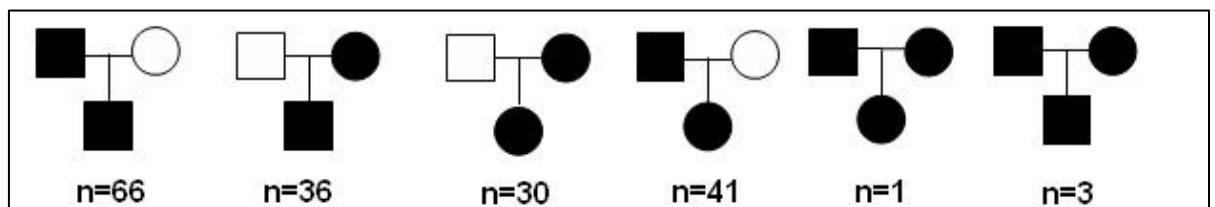


Figure 1: examples of families present in this study.

Control group

Control group was formed by 294 samples of DNA from normal newborns and mothers with no familial history of CL/P. The samples had been obtained previously for the project: “Fatores ambientais, polimorfismo C677T no gene MTHFR: Interação gene-ambiente na etiologia da fissura de lábio com ou sem fissura de palato não-sindrômica”, that had ethical approval and a informed consent was obtained by mail.

Genotyping

Determination of the genotype with respect to Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) was performed according to one of two protocols on an automatic sequence-detection system (ABI Prism 7900HT, Applied Biosystems) using TaqMan analysis (Applied Biosystems). Genotyping assays were obtained from Applied Biosystems, either through the Assay-on-Demand service. Reactions

were carried out with use of standard conditions, as specified by the manufacturer. The SNPs were chosen by using the HapMap project or based in previous studies of our group. Table 1 shows all the SNPs used in this study.

Table 1: genes and SNPs analyzed in this study.

SNPs	GENES						
	IRF6	TGFB3	FGFR1	TGFA	FOXE1	MSX1	BMP4
rs2235371(V274I)	rs3917210	rs10958704	rs454305	rs894673	rs12352	rs17563	
rs4844880	rs3917101	rs13317	rs3732253	rs3758249	rs4075	rs2761884	
rs2013162	rs2284792	rs6996321	rs2902345	rs874004			
rs126280	rs2268626	rs881301					
rs223577	rs11159161						
rs181019	rs11159163						
rs17015224							

To detect CA repeat polymorphisms in MSX1, single strand conformational analysis (SSCP) was performed. The amplified products were separated on MDE (Mutation Detection Enhancement) nondenaturing gels for 5–6 hours at 20W at room temperature with fans, gels were loaded with either internal controls consisting of samples with known genotypes (Lidral et al., 1998). DNA bands were visualized by silver staining and inspected for potential variants (Budwole et al., 1991).

Statistical analysis

We analyzed the inheritance of each marker in all families, using PedCheck software to test for inconsistencies due to nonpaternity or other errors.

Statistical tests were performed within the standard transmission disequilibrium test framework (TDT). Alleles at each marker were tested for association with cleft lip or palate with the use of the FBAT program (Family Based Association Test software) was used for overall TDT calculations, where the biallelic TDT compares each allele to all others and the multiallelic TDT simultaneously tests the distribution of all alleles. For parent-specific TDT calculations, the S.A.G.E. (Statistical analysis for genetic epidemiology), v 5.1 program was used. The entire dataset was analyzed, as well as two subsets of the data, as follows: (1) subset in which the mothers were affected; (2) subset in which the fathers were affected. In contrast to S.A.G.E., FBAT cannot separate maternal and paternal transmission calculations, but it utilizes all parental genotype information.

We also looked for gene-gene interaction using SNPs that showed positive or borderline association. For this one we first obtained per-family FBAT Z scores for each pedigree for every SNP. The p-values from these analyses are included in the in the table 4. Additionally, we made some inference about whether each gene-gene analysis indicates interaction (2 genes working together) or heterogeneity (2 genes working independently). This is determined by seeing whether the sign of the correlation coefficient (or regression estimate) is positive or negative between each of the 2 SNPs' population-wide associated alleles. A positive correlation between the two over-transmitted alleles is interpreted as interaction, while a negative correlation is considered heterogeneity.

Sequencing

We sequenced all the exons of the candidate genes IRF6, MSX1 and BMP4, templates for sequencing were generated by Polymerase Chain Reaction (PCR) in an Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The 10- μ L reactions contained 1.5 mM Mg²⁺, 200 mM dNTPs, 0.3 mM each primer, and 0.25 units of Bioexact or Biolase reaction buffer (Bioline USA, Inc., Randolph, MA) and 20 ng to 40 ng of DNA. The PCR conditions were variable according to the primers used. Sequencing then was performed with the DNA sequencing kit, Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA). The 10- μ L sequencing chemistry reactions contained Big Dye Terminator Mix, Big Dye Terminator Buffer reaction, 0.075 mM of the corresponding primer, 1.25 ng per 100 bp of the PCR product, and 5% of DMSO, and were run using at least 40 cycles. Sequencing reactions were resolved on an ABI Prism 3700 analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analyzed by Polyphred 4.0 (<http://droog.mbt.washington.edu/polypdoc40.html>) and Consed (<http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysistools/consed.cfm>) and manually inspected to verify differences and detect possible mutations missed by the algorithm. The primers used were designed using the primer 3 Web site (<http://frodo.wi.mit.edu>). All the primers used in this study as well as the PCR and sequencing conditions are listed on table 2.

Results

Association Test (TDT)

Transmission disequilibrium calculations were performed for the entire dataset as well as for data on subgroups defined according to the parent affection

status (affected X unaffected parent transmission), families cleft type (affected individuals with CL only, CLP only and CL+CLP) and sex of the affected parent (affected mother X affected father transmission).

For the entire dataset we found association with markers in the genes IRF6 (p-value=0.02), MSX1 (p-value=0.01) and TGFB3 (p-value= 0.04 and 0.006). When we analyzed the subgroups based on the families cleft type we found association with TGFB3 (p-value=0.007) for the families with CL individuals and families with individuals affected with CLP (p-value=0.02). For the families presenting both CL and CLP individuals we found association with MSX1 (p-value=0.01) and TGFA (p-value=0.02) that was not significant for all the other groups. These data is summarized in table 3.

Table3:TDT (FBAT) significant results for overall and subgroups analysis									
Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P	
ALL N=167									
IRF6SNP9	1	0,947	20	35	30		5	2,236	0,025347
IRF6SNP9	2	0,053	20	5	10		5	-2,24	0,025347
MSX1rs12532	1	0,605	83	86	98,5	28,25	-2,35	0,018683	
MSX1rs12532	2	0,395	83	86	73,5	28,25	2,352	0,018683	
TGFB3rs11159161	1	0,473	78	93	83	25,5	1,98	0,04767	
TGFB3rs11159161	2	0,527	78	69	79	25,5	-1,98	0,04767	
TGFB3rs11159163	1	0,363	79	52	66	26,5	-2,72	0,006536	
TGFB3rs11159163	2	0,637	79	110	96	26,5	2,72	0,006536	

CL N=25									
TGFB3rs11159161	1	0,537	14	20	14,5	4,25	2,668	0,007633	
TGFB3rs11159161	2	0,463	14	8	13,5	4,25	-2,67	0,007633	
CLP N=79									
TGFB3rs11159163	1	0,37	36	23	31	12,5	-2,26	0,023652	
TGFB3rs11159163	2	0,63	36	49	41	12,5	2,263	0,023652	
CL/CLP N=59									
TGFars454305	1	0,595	26	37	30,5	8,25	2,263	0,023635	
TGFars454305	2	0,405	26	17	23,5	8,25	-2,26	0,023635	
MSX1rs12532	1	0,623	34	36	44,5	12,25	-2,43	0,015158	
MSX1rs12532	2	0,377	34	38	29,5	12,25	2,429	0,015158	

Gray lines show the overtransmitted allele for each marker; $p < 0,05$; afreq=allele frequency; fam#=informative families number; O=observed; E=expected; Var=variance; Z=Z value; P=p-value; N=total families number (this number is 167 and not 176 as collected samples because some samples were bad quality and could not be genotyped).

We analyzed the subgroup based on parent affection status using the S.A.G.E. program that makes parent-specific TDT calculations and compares to the overall group. The table 4 shows that we found a significant association on the overall group with the genes IRF6 (p-value=0.02), MSX1 (p-value=0.01) and TGFB3 (p-value=0.03 and 0.006) and when compared with the parent affection status group we saw that the association was kept for the genes MSX1 and TGFB3. Curiously the MSX1-CA marker that did not show association with the overall group gave a significant p-value for the affected parent transmission (p=0.03) which was more significant (p=0.008) for the affected parent transmission on families with CLP individuals. Also the MSX1 SNP association was more significant with the CL/CLP set of families.

When we looked to the allele transmission based on the sex of the affected parent (affected mother X affected father transmission) we found borderline association with the genes MSX1 (p-value=0.03) and TGFB3 (p-value=0.005) only for the affected mother transmission (table 5), the affected father subgroup showed only borderline p-values (0.06) for the IRF6 SNPs (data not shown).

Table4: S.A.G.E. analysis for Affected Parent Transmission					
MARKERS	Overall	Affected Parent Transmission	Unaffected Parent Transmission	N Inform Fams	
ALL N=167					
IRF6SNP9	0,02	0,69	0,02	20	
MSX1rs12532	0,01	0,05	0,15	81	
MSX1CA	0,18	0,03	0,11	95	
TGFB3rs11159161	0,03	0,08	0,24	83	
TGFB3rs11159163	0,006	0,15	0,02	80	
CL N=25					
TGFB3rs11159161	0,007	0,12	0,07	16	
CLP N=79					
IRF6SNP12		0,08	0,14	20	
MSX1CA	0,27	0,008	0,57	38	
TGFB3rs11159163	0,01	0,21	0,04	33	
CL/CLP N=59					
MSX1rs4075	0,34	0,06	0,51	28	
MSX1rs12532	0,006	0,03	0,14	31	

only significant markers are listed in this table.

Table5: Pedigrees with Affected Mother									
Marker	Allele	afreq	fam#	S	E(S)	Var(S)	Z	P	
ALL N=77									
TGFB3rs3917210	1	0,818	20	36	29	6,5	2,746	0,00604	
TGFB3rs3917210	2	0,182	20	8	15	6,5	-2,746	0,00604	
TGFB3rs11159163	1	0,374	31	20	29,5	11,75	-2,771	0,005581	
TGFB3rs11159163	2	0,626	31	46	36,5	11,75	2,771	0,005581	
MSX1rs12532	1	0,603	35	37	44,5	12,25	-2,143	0,032125	
MSX1rs12532	2	0,397	35	39	31,5	12,25	2,143	0,032125	
CL+CLP families=32									
TGFB3rs11159163	1	0,324	14	7	12,5	5,25	-2,4	0,016377	
TGFB3rs11159163	2	0,676	14	25	19,5	5,25	2,4	0,016377	
MSX1rs12532	1	0,632	16	19	24	6	-2,041	0,041227	
MSX1rs12532	2	0,368	16	19	14	6	2,041	0,041227	

Gray lines show the overtransmitted allele for each marker; $p < 0,05$; afreq=allele frequency; fam#=informative families number; O=observed; E=expected; Var=variance; Z=Z value; P=p-value; N=total families number

Sequencing results

We sequenced all exons of the genes IRF6, MSX1 and BMP4 in all the 176 probands and some selected exons in the parents (when a variant was found on the probands). Table 6 summarizes the results for direct sequencing. The IRF6 gene analysis showed 6 common and known SNPs in non-coding regions, 1 new mutation in the 3'UTR region after exon 9 and 5 synonymous mutations that were also found in controls. For the MSX1 gene we observed 8 common and known SNPs in non-coding regions, including the 11bp deletion reported by Jezewski et al. (2003); 2 synonymous mutation and 3 non-synonymous mutations, 1 of them were found in an affected mother but the probands doesn't has and the other 2 were also found in controls and previously reported (Jezewski et al., 2003). The analysis of the BMP4 gene revealed 3 common and known intronic SNPs and 1 new on intron 3 present both in the probands and affected mother; we also saw a common coding SNPs and 2 new variants, 1 synonymous mutation, and 1 variant in the 3'UTR 88bp after the stop codon but this one was also saw in controls and the TDT analysis didn't show significant values. We performed analysis on the ESEfinder website (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) to search for possible alterations in exonic splicing enhancers and also on the Polyphen website (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>) to check the damaging status of the non-synonymous variants.

Table 6: sequencing results, variants and mutations found					
Gene	Localization	Type	AA change	Polyphen Prediction	ESE Prediction
IRF6	Intron1(rs2235377)	non-coding	-	-	-
	Intron3 (rs7552506)	non-coding	-	-	-
	Intron4 (rs17015224)	non-coding	-	-	-
	Intron6 (rs2235375)	non-coding	-	-	-
	Intron7 (rs2235373)	non-coding	-	-	-
	Exon2 (rs861019)	non-coding	-	-	-
	Exon5 (rs34907424)	synonymous	G130G	-	eliminates 1 binding site
	Exon5 (rs2013162)	synonymous	S153S	-	eliminates 2 binding sites
	Exon7 (rs2235371)	non-synonymous	V274I	benign	eliminates 1 binding site
	Exon8	synonymous	L385L	-	creates 2 binding sites
	Exon9	synonymous	K437K	-	eliminates 1 binding site
Exon9 (UTR)	non-coding	-	-	-	
MSX1	Intron1 (11 bp deletion)*	non-coding	-	-	-
	Intron1 (rs7660910)	non-coding	-	-	-
	Intron1 (rs3111690)	non-coding	-	-	-
	Intron1 (rs10213148)	non-coding	-	-	-
	Intron1 (rs10000804)	non-coding	-	-	-
	Intron1 (rs36946149)	non-coding	-	-	-
	Intron1 (rs1042484)	non-coding	-	-	-
	Intron1 (rs35871751)	non-coding	-	-	-
	Exon1	non-synonymous	A23V	benign	eliminates 1 binding site
	Exon1	non-synonymous	A34G	benign	creates 3 binding sites eliminates 1 binding site
Exon1	non-synonymous	P67L	possibly damaging	eliminates 1 binding site	

	Exon1	synonymous	G110G	-	eliminates 1 binding site
	Exon1	synonymous	K116K	-	eliminates 2 binding sites
BMP4	Intron2 (rs2761880)	non-coding	-	-	-
	Intron2 (rs35107139)	non-coding	-	-	-
	Intron3 (new)	non-coding	-	-	-
	Intron3 (rs2071047)	non-coding	-	-	-
	Exon3 (new)	synonymous	L26L	-	creates 1 binding site
	Exon4 (rs17563)	non-synonymous	A152V	benign	-
	Exon4 (new)	non-coding	-	-	-
FOXE1	Exon1 (rs1867277)	non-coding	-	-	-
	Exon1 (rs1867278)	non-coding	-	-	-
	Exon1 (rs1867279)	non-coding	-	-	-
	Exon1 (rs1867280)	non-coding	-	-	-
	Exon1	synonymous	A29A	-	-
	Exon1	non-synonymous	G37R	benign	eliminates 2 binding site
	Exon1 (rs3021523)	synonymous	L129L	-	-
	Exon1	non-synonymous	P190R	probably damaging	creates 2 binding sites
	Exon1 (rs3021526)	synonymous	S275S	-	-

* 11bp deletion is described at Jezewski et al.(2003)

Discussion and Conclusion

One of the challenges of studying complex disorders, such as isolated cleft lip and palate, is the likely genetic and allelic heterogeneity that underlies inherited contributions to these disorders. By selecting for study families that have two or more affected individuals in two or more consecutive generations, one can presumably enhance the presence of strong genetic contributors and perhaps even single gene contributors. Several genes have already been demonstrated in which nonsense or missense mutations can result in highly penetrate cleft lip and palate phenotypes based on this single mutation, including the MSX1 (Ban, Boogaard, Suzuki references), FGFR1 (Dode, et al., 2003), TBX22 (Marcano, et al., 2004) and possibly several other genes with individual point mutations demonstrated (Vieira, et al., 2005; Watanabe, et al., 2006; Warrington et al., 2006). One could undertake a study of such families to determine how common point mutations in candidate genes might be found in them, demonstrating parent

to child transmission and subsequently to also then study the impact on genetic counseling.

In this study, we undertook to examine seven candidate genes using both association studies using SNPs as well as direct medical sequencing of the coding and flanking regulatory regions of those genes. In the aggregate, we found only weak evidence for association in multiple different sets of comparisons and none that remain significant after adjusting for multiple comparisons. Although the sample size used here is modest by some standards for having the availability of two generations of affected individuals, it is a substantive enough collection that should genetic effects have been strong, we would have expected to identify at least some contributors.

Secondly, in carrying out direct medical resequencing, we identified only a small number of mutations that are of potential interest and none of these that could be directly confirmed either through strong genetic evidence such as nonsense, destructive missense or splice-site variants or through functional analysis. Two interesting non-synonymous mutations were found, one at the MSX1 gene (P167L) and other at the FOXE1 gene (P190R). The first one was found in the affected mother but not in the probando and the second one was found in 4 probans and 3 unaffected mothers and 1 affected father.

The presence of mutations like these 2 found here reinforce the idea of a polygenic etiology in which the interaction of distinct mutations is the major cause of NS-CLP. Other possibility is that the mutation acts like a modifier or predisposing factor disrupting a metabolic pathway in some point of the embryonic development causing the cleft.

In the aggregate, this study appears to reject the hypothesis that single gene mutations will be strong contributors to isolated cleft lip and palate found in multiple consecutive generations and in addition that there is also not a very strong common trait contribution in either single gene or gene-by-gene analysis of a candidate gene selected for study here. But it reinforced the need for additional efforts to look at gene-by-gene and gene by gene interactions even in those families which appear to have the strongest underlying genetic components.

Acknowledgments

First we are very grateful for the many families and their children who willingly participated in this study. We would like to thank Adela Mansilla and Marla Johnson for substantial technical help. This project had financial support from CNPq, NIH Grant DE08559 and Fundação Lucentis de Apoio à Cultura, Ensino, Pesquisa e Extensão.

5. REFERÊNCIAS*

ALBUISSON, J.; PÊCHEUX, C.; CAREL, J.C.; LACOMBE, D.; LEHEUP, B.; LAPUZINA, P.; BOUCHARD, P.; LEGIUS, E.; MATTHIJS, G.; WASNIEWSKA, M.; DELPECH, M.; YOUNG, J.; HARDELIN, J.P.; DODE, C. Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2). **Hum. Mutat.**, v.25, p.98-99, 2005.

ARDINGER, H.; BUETOW, K.; BELL, G.; BARDAUCH, J.; VAN DEMARK, D.; MURRAY, J.C. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. **Am. J. Hum. Genet.**, v.45, p.348-353, 1989.

BAILEY, L.J.; JOHNSTON, M.C.; BILLET, J. Effects of carbon monoxide and hypoxia on cleft lip in A/J mice. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.32, n.1, p.14-19, 1995.

BEATY, T.; MAESTRI, N.; HETMANSKI, J.; WYSZYNSKI, D.; VANDERKOLK, C.; SIMPSON, J.; MCINTOSH, I.; SMITH, E.; ZEIGER, J.; RAYMOND, G.; PANNY, S.; TIFFT, C.; LEWANDA, A.; CRISTION, C.; WULFSBERG, E. Testing for interaction between maternal smoking and *TGFA* genotype among oral cleft cases born in Maryland 1992-1996. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.34, n.5, p.447-454, 1997.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 2001. 240p.

BEATY, T.H.; WANG, H.; HETMANSKI, J.B.; FAN, Y.T.; ZEIGER, J.S.; LIANG, K.Y.; CHIU, Y.F.; VANDERKOLK, C.A.; SEIFERT, K.C.; WULFSBERG, E.A.; RAYMOND, G.; PANNY, S.R.; MCINTOSH, I. A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. **Ann. Epidemiol.**, v.11, p.434-442, 2001.

BEATY, T.; HETMANSKI, J.; ZEIGER, J.; FAN, Y.; LIANG, K.; VANDERKOLK, C.; MCINTOSH, I. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. **Genet. Epidemiol.**, v.22, p.1-11, 2002.

BECKER, M.; SVENSSON, H.; KALLEN, B. Birth weight, body length, and cranial circumference in newborns with cleft lip or palate. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.35, n.3, p.255-261, 1998.

BELL, J.R.; NOVEEN, A.; LIU, Y.H.; MA, L.; DOBIAS, S.; KUNDU, R.; JUO, W.; XIA, Y.; LUSIS, A.J.; SNEAD, M.L.; MAXSON, R. Genomic structure, chromosomal location, and evolution of the mouse *Hox 8* gene. **Genomics**, v.16, p.123-131, 1993.

BENDER, P.L. Genetics of cleft lip and palate. **J. Pediatr. Nurs.**, v.15, n.4, p.242-249, 2000.

BENNETT, J.; EFAW, D. Orthognathic surgery in the patient with cleft lip and palate. **Atlas Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, v.3, n.1, p.51-61, 1995.

BLANCO, R.; CHAKRABORTY, R.; BARTON, S.A.; CARRENO, H.; PAREDES, M.; JARA, L.; PALOMINO, H.; SCHULL, W.J. Evidence of a sex-dependent association between the *MSX1* locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chilean population. **Hum. Biol.**, v.73, p.81-89, 2001.

BLIN-WAKKACH, C.; LEZOT, F.; GHOUL-MAZGAR, S.; HOTTON, D.; MONTEIRO, S.; TEILLAUD, C.; PIBOUIN, L.; ORESTES-CARDOSO, S.; PAPAGERAKIS, P.; MACDOUGALL, M.; ROBERT, B.; BERDAL, A. Endogenous *Msx1* antisense transcript: In vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.7336-7341, 2001.

BRAND, R.; ISSELHARD, D. **Anatomy of orofacial structures**. St. Louis: Mosby, 2003. 527 p.

BRAYBROOK, C.; DOUDNEY, K.; MARCANO, A.C.; ARNASON, A.; BJORNSSON, A.; PATTON, M.A.; GOODFELLOW, P.J.; MOORE, G.E.; STANIER, P. The T-box transcription factor gene *TBX22* is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. **Nat. Genet.**, v.29, p.179-183, 2001.

BURDICK, A.B.; BIXLER, D.; PUCKETT, C.L. Genetic analysis in families with Van der Woude Syndrome. **J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.**, v.5, p.181-208, 1985.

CARSTENS, M. Development of the facial midline. **J. Craniofac. Surg.**, v.13, n.1, p.129-187, 2002.

CARLSSON, P.; MAHLAPUU, M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. **Dev. Biol.**, v.250, n.1, p.1-23, 2002.

CARTWRIGHT, M.M.; SMITH, S.M. Increased cell death and reduced neural crest cell numbers in ethanol-exposed embryos: partial basis for the fetal alcohol syndrome phenotype. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.19, p.378-386, 1995.

CASTANET, M.; PARK, S.M.; SMITH, A.; BOST, M.; LEGER, J.; LYONNET, S.; PELET, A.; CZERNICHOW, P.; CHATTERJEE, K.; POLAK, M. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. **Hum. Mol. Genet.**, v.11, n.17, p.2051-2059, 2002.

CELLI, J.; DUIJF, P.; HAMEL, B.C.; BAMSHAD, M.; KRAMER, B.; SMITHS, A.P.T.; NEWBURY-ECOB, R.; HENNEKAM, R.C.; VAN BUGGENHOUT, G.; VAN HAERINGEN, A.; WOODS, C.G.; VAN ESSEN, A.J.; DE WAAL, R.; VRIEND, G.; HABER, D.A.; YANG, A.; McKEON, F.; BRUNNER, H.G.; VAN BOKHOVEN, H. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are cause of EEC syndrome. **Cell**, v.99, p.143-153, 1999.

CEMBRANO, J.R.J.; VERA, J.S.; JOAQUINO, J.B.; TONGSON, T.L.; MANALO, P.D.; FERNANDEZ, G.C.; ENCARNACION, R.C. Familial risk of recurrence of cleft lip and palate. **Philipp. J. Surg. Surg. Spec.**, v.50, p.37-40, 1995

CHAPMAN, R.S.; DUFF, E.K.; LOURENCO, P.C.; TONNER, E.; FLINT, D.J.; CLARKE, A.R.; WATSON, C.J. A novel role for IRF-1 as a suppressor of apoptosis. **Oncogene**, v.19, n.54, p.6386-6391, 2000.

CHENEVIX-TRENCH, G.; JONES, K.; GREEN, A.; MARTIN, N. Further evidence for an association between genetic variation in transforming growth factor alpha and cleft lip and palate. **Am. J. Hum. Genet.**, v.48, p.1012-1013, 1991.

CHRISTENSEN, K.; FOGH-ANDERSEN, P. Cleft lip (+ cleft palate) in Danish twins, 1970-90. **Am. J. Med. Genet.**, v.47, p.910-916, 1993.

CHRISTENSEN, K.; OLSEN, J.; NORGAARD-PEDERSEN, B.; BASSO, O.; STOVRING, H.; MILHOLLIN-JOHNSON, L.; MURRAY, J.C. Oral clefts, transforming growth factor alpha gene variants, and maternal smoking: a population-based case-control study in Denmark, 1991-1994. **Am. J. Epidemiol.**, v.149, p.248-255, 1999.

CHUNG, C.S.; BEECHERT, A.M. Genetic epidemiology of cleft lip with or without cleft palate in the population of Hawaii. **Genet. Epidemiol.**, v.4, p.415-423, 1987.

CHUNG, K.C.; KOWALSKI, C.P.; KIM, H.M.; BUCHMAN, S.R. Maternal cigarette smoking during pregnancy and the risk of having a child with cleft lip/palate. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.105, n.2, p.485-491, 2000.

CLARREN, S.K.; ANDERSON, B.; WOLF, L.S. Feeding infants with cleft lip, cleft palate, or cleft lip and palate. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.24, n.3, p.244-249, 1987.

CLIFTON-BLIGH, R.; WENTWORTH, J.; HEINZ, P.; CRISP, M.; JOHN, R.; LAZARUS, J.; LUDGATE, M.; CHATTERJEE, V. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate, and choanal atresia. **Nat. Genet.**, v.19, p.399-401, 1998.

CROEN, L.A.; SHAW, G.M.; MASSERMAN, C.R.; TOLAROVA, M.M. Racial and ethnic variations in prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. **Am. J. Med. Genet.**, v.79, p.42-47, 1998.

CUERVO, R.; COVARRUBIAS, L. Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. **Development**, v.131, n.1, p.15-24, 2004.

CUI, X.M.; CHAI, Y.; CHEN, J.; YAMAMOTO, T.; ITO, Y.; BRINGAS, P.; SHULER, C. TGF- β 3-dependent SMAD2 phosphorylation and inhibition of MEE proliferation during palatal fusion. **Dev. Dyn.**, v.227, p.387-394, 2003.

CZEIZEL, A.E.; TIMAR, L.; SARKOZI, A. Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. **Pediatrics**, v.104, p.66, 1999.

DAVIDSON, D. The function and evolution of *MSX1* genes: pointers and paradoxes. **Trends Genet.**, v.11, p.405-411, 1995.

DE FELICE, M.; OVITT, C.; BIFFALI, E.; RODRIGUEZ-MALLON, A.; ARRA, C.; ANASTASSIADIS, K.; MACCHIA, P.E.; MATTEI, M.G.; MARIANO, A.; SCHOLER, H.; MACCHIA, V.; DI LAURO, R. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. **Nat. Genet.**, v.4, p.395-398, 1998.

DE MOERLOOZE, L.; SPENCER-DENE, B.; REVEST, J.; HAJIHOSSEINI, M.; ROSEWELL, I.; DICKSON, C. **Development**, v.127, p.483-492, 2000.

PAULA, L.A.M. **Fatores ambientais e polimorfismo C677T no gene MTHFR: interação gene-ambiente na etiologia da fissura de lábio com ou sem fissura de palato não-sindrômica.** 2003. 150f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DIEWART, V.; SHIOTA, K. Morphological observations in normal primary palate and cleft lip embryos in the kyoto collection. **Teratology**, v.41, p.663-677, 1990.

DODÉ, C.; HARDELIN, J.P. Kallmann syndrome: fibroblast growth factor signaling insufficiency? **J. Mol. Med.**, v.82, p.725-734, 2004.

DODE, C.; LEVILLIERS, J.; DUPONT, J.M.; DE PAEPE, A.; LE DU, N.; SOUSSI- YANICOSTAS, N.; COIMBRA, R.S.; DELMAGHANI, S.; COMPAIN-NOUAILLE, S.; BAVEREL, F.; PÊCHEUX, C.; LE TESSIER, D.; CRUAUD, C.; DELPECH, M.; SPELEMAN, F.; VERMEULEN, S.; AMALFITANO, A.; BACHELOT, Y.; BOUCHARD, P.; CABROL, S.; CAREL, J.C.; DELEMARRE-

VAN DE WAAL, H.; GOULET-SALMON, B.; KOTTLER, M.L.; RICHARD, O.; SANCHEZ-FRANCO, F.; SAURA, R.; YOUNG, J.; PETIT, C.; HARDELIN, J.P. Loss-of-function mutations in *FGFR1* cause autosomal dominant Kallmann syndrome. **Nat. Genet.**, v.33, p.463-465, 2003.

ENDRIGA, M.C.; KAPP-SIMON, K.A. Psychological issues in craniofacial care: state of the art. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.36, n.1, p.3-11, 1999.

EROSHKIN, A.; MUSHEGIAN, A. Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens. **J. Mol. Med.**, v.77, n.5, p.403-405, 1999.

FALLIN, M.D.; HETMANSKI, J.B.; PARK, J.; SCOTT, A.F.; INGERSOLL, R.; FUERNKRANZ, H.A.; McINTOSH, I.; BEATY, T.H. Family-based analysis of *MSX1* haplotypes for association with oral clefts. **Genet. Epidemiol.**, v.25, p.168-175, 2003.

FARRAL, M.; HOLDER, S. Familial recurrence-pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate. **Am. J. Hum. Genet.**, v.50, p.270-277, 1992.

FARRALL, M.; BUETOW, K.H.; MURRAY, J.C. Resolving an apparent paradox concerning the role of TGFA in CL/P. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 52, n.2, p.434-437, 1993.

FENG, H.; SASSANI, R.; BARLETT, S.P.; LEE, A.; HECTH, J.T.; MALCLM, S.; WINTER, R.M.; VINTINER, G.M.; BUETOW, K.H.; GASSER, D.L. Evidence from family studies for linkage disequilibrium between *TGFA* and a gene for nonsyndromic cleft lip with or without palate. **Am. J. Hum. Genet.**, v.55, p.932-936, 1994.

FERGUSON, C.A.; TUCKER, A.S.; SHARPE, P.T. Temporospacial cell interactions regulating mandibular and maxillary arch patterning. **Development**, v.127, p.403-412, 2000.

FOGH-ANDERSEN, P. **Inheritance of harelip and cleft palate**. Copenhagen: Munksgaard, 1942. 266 p.

FRASER, F.C. Some experimental and clinical studies on the causes of congenital clefts of the palate and the lip. **Arch. Pediatr.**, v.77, p.151-156, 1960.

FRASER, F.C. The genetics of clefts lip and palate: yet another look. In: PRATT, R.M.; CHRISTIANSEN, R.L. (Eds.). **Current research trends in prenatal craniofacial development**. Amsterdam: Elsevier North Holland, 1980. 456 p.

GHASSIBE, 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. **Eur. J. Hum. Genet.**, v.13, n.11, p.1239-1242, 2005.

GHASSIBE, M.; BAYET, B.; REVCU, N.; DESMYTER, L.; VERELLEN-DUMOULIN, C.; GILLEROT, Y.; DEGGOUJ, N.; VANWIJCK, R.; VIKKULA, M.; OROFACIAL CLEFTING: UPDATE ON THE ROLE OF GENETICS. CL/P Study Group. **B-ENT**, v.2, suppl.4, p.20-24, 2006.

GORLIN, R.J.; COHEN, M.M.; HENNEKAM, R.C.M. **Syndromes of the head and neck**. 4.ed. United States: Oxford University Press, 2001. 1283 p.

HARADA, H.; KITAGAWA, M.; TANAKA, N.; YAMAMOTO, H.; HARADA, K.; ISHIHARA, M.; TANIGUCHI, T. Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and 2. **Science**, v.259, p.971-974, 1993.

HECHT, J.T.; YANG, P.; MICHELS, V.V.; BUETOW, K.H. Complex segregation analysis of nonsyndromic cleft lip and palate. **Am. J. Hum. Genet.**, v.49, p.674-681, 1991.

HERING, R.; GRUNDMANN, K. The *IRF6* p.274V polymorphism is not a risk factor for isolated cleft lip. **Genet. Med.**, v.7, n.3, p.209, 2005.

HEWITT, J.E.; CLARK, L.N.; IVENS, A.; WILLIAMSON, R. Structure and sequence of the human homeobox gene *HOX7*. **Genomics**, v.11, p.670-678, 1991.

HOLDER, S.E.; VINTINER, G.M.; FARREN, B.; MALCOLM, S.; WINTER, R.M. Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor alpha locus and nonsyndromic cleft lip and palate. **J. Med. Genet.**, v.29, p.390-392, 1992.

HOLLAND, P.W.H. Cloning and evolutionary analysis of msh like *homeobox* genes from mouse, zebrafish and ascidian. **Gene**, v.98, p.253-257, 1991.

HORIKAWA, Y.; ODA, N.; COX, N.J.; LI, X.; ORHO-MELANDER, M.; HARA, M.; HINOKIO, Y.; LINDNER, T.H.; MASHIMA, H.; SCHWARZ, P.E.; DEL BOSQUE-PLATA, L.; HORIKAWA, Y.; ODA, Y.; YOSHIUCHI, I.; COLILLA, S.; POLONSKY, K.S.; WEI, S.; CONCANNON, P.; IWASAKI, N.; SCHULZE, J.; BAIER, L.J.; BOGARDUS, C.; GROOP, L.; BOERWINKLE, E.; HANIS, C.L.; BELL, G.I. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. **Nat. Genet.**, v.26, p.163-175, 2000.

HOUDAYER, C.; BONAITI-PELLIE, C.; ERGUY, C.; SOUPRE, V.; DONDON, M.G.; BURGLEN, L.; COUGOUREUX, E.; COUDERC, R.; VAZQUEZ, M.P.; BAHUAU, M. Possible relationship between the van der Woude syndrome (vWS) locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL/P). **Am. J. Med. Genet.**, v.104, p.86-92, 2001.

HU, G.; LEE, H.; PRICE, S.M.; SHEN, M.M.; ABATE-SHEN, C. *Msx homeobox genes human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth humans. Nat. Genet.*, v.24, p.342-343, 2000.

HWANG, S.J.; BEATY, T.H.; PANNY, S.R.; STREET, N.A.; JOSEPH, J.M.; GORDON, S.; MCINTOSH, I.; FRANCOMANO, C.A. Association study of transforming growth factor alpha (TGF alpha) TaqI polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects. **Am. J. Epidemiol.**, v.141, n.7, p.629-636, 1995.

ICHIKAWA, E.; WATANABE, A.; NAKANO, Y.; AKITA, S.; HIRANO, A.; KINOSHITA, A.; KONDO, S.; KISHINO, T.; UCHIYAMA, T.; NIIKAWA, N.; YOSHIURA, K. *PAX9 and TGFB3 are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analyses. J. Hum. Genet.*, v.51, n.1, p.38-46, 2006

ITIKALA, P.R.; WATKINS, M.L.; MULINARE, J. Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. **Teratology**, v.63, p.79-86, 2001.

ITO, Y.; YEO, J.Y.; CHYTIL, A.; HAN, J.; BRINGAS, P.; NAKAJIMA, A.; SHULER, C.; MOSES, H.; CHAI, Y. Conditional inactivation of *Tgfbr2* in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. **Dev. Dis.**, v.130, p.5269-5280, 2003.

IVENS, A.; FLAVIN, A.; WILLIAMSON, R.; DIXON, M.; BATES, G.; BUCKINGHAM, M.; ROBERT, B. The human *homeobox* gene *HOX7* maps to chromosome 4p16.1 and may be implicated in Wolf-Hirschhorn syndrome. **Hum. Genet.**, v.84, p.473-476, 1990.

JASKOLL, T.; LUO, W.; SNEAD, M.L. *Msx2* expression and glucocorticoid-induced over expression in embryonic mouse submandibular glands. **J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.**, v.18, p.79-87, 1998.

JEZEWSKI, P.A.; VIEIRA, A.R.; NISHIMURA, C.; LUDWIG, M.; JOHNSON, M.; O'BRIEN, S.E.; DAACK-HIRSCH, S.; SCHULTZ, R.E.; WEBER, A.; NEPOMUCENA, B.; ROMITTI, P.A.; CHRISTENSEN, K.; ORIOLI, I.M.; CASTILLA, E.E.; MACHIDA, J.; NATSUME, N.; MURRAY, J.C. Complete sequencing shows a role for *MSX1* in non-syndromic cleft lip and palate. **J. Med. Genet.**, v.40, p.399-407, 2003.

JONKLAAS, J. Atypical presentation of a patient with both kallmann syndrome and a craniopharyngioma: case report and literature review. **Endocr. Pract.**, v.11, p.30-36, 2005.

JORDAN, R.; WILSON, J.; SCHUMACHER, H. Embryotoxicity of the folate antagonist methotrexate in rats and rabbits. **Teratology**, v.15, p.73-80, 1977.

JOWETT, A.K.; VAINIO, S.; FERGUSON, M.W.; SHARPE, P.T.; THESLEFF, I. Epithelial-mesenchymal interactions are required for *MSX1* and *Msx2* gene

expression in the development murine molar tooth. **Development**, v.117, p.461-470, 1993.

JUGESSUR, A.; LIE, R.T.; WILCOX, A.J.; MURRAY, J.C.; TAYLOR, J.A.; SAUGSTAD, O.D.; VINDENES, H.A.; ABYHOLM, F. Variants of developmental genes (*TGFA*, *TGFB3*, and *MSX1*) and their association with oral clefts: a case-parent triad analysis. **Genet. Epidemiol.**, v.24, p.1-10, 2003.

JUMLONGRAS, D.; BEI, M.; STIMSON, J.M.; WANG, W.F.; DEPALMA, S.R.; SEIDMAN, C.E.; FELBOR, U.; MASSD, R.; SEIDMAN, J.G.; OLSEN, B.R. A nonsense mutation in *MSX1* causes Witkop syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, v.69, n.1, p.67-74, 2001.

KAARTINEN, V.; CUI, X.M.; HEISTERKAMP, N. Transforming growth factor- β 3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of basement membrane. **Dev. Dyn.**, v.209, p.255-260, 1997.

KEMALOGLU, Y.K. Craniofacial anatomy and otitis media. **Am. J. Otol.**, v.20, n.4, p.556-558, 1999.

KERNAHAN, D.A. Classification of cleft lip and palate. In: KERNAHAN, D.A.; ROSENSTEIN, S.W.; DADO, D.V. (Eds.). **Cleft lip and palate: a system of management**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990. p.13-19.

KERRIGAN, J.; MANSELL, J.; SENGUPTA, A.; BROWN, N.; SANDY, J. Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. **J. R. Coll. Surg. Edinb.**, v.45, p.351-358, 2000.

KIM, H.J.; RICE, D.P.C.; KETTUNEN, P.J.; THESLEF, I. FGF-BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. **Development**, v.125, p.1241-1251, 1998.

KIM, M.H.; KIM, H.J.; CHOI, J.Y.; NAHM, D.S. Transforming growth factor-beta3 gene SfaN1 polymorphism in Korean nonsyndromic cleft lip and palate patients. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v.30, n.6, p.533-537, 2003.

KIM, H.G.; HERRICK, S.R.; LEMYRE, E.; KISHIKAWA, S.; SALISZ, J.A.; SEMINARA, S.; MACDONALD, M.E.; BRUNS, G.A.; MORTON, C.C.; QUADE, B.J.; GUSELLA, J.F. Hypogonadotropic hypogonadism and cleft lip and palate caused by a balanced translocation producing haploinsufficiency for FG FR1. **J. Med. Genet.**, v.42, p.666-672, 2005.

KIRCHHOFF, S.; SCHAPER, F.; HAUSER, H. Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivation of downstream target genes. **Nucleic Acids Res.**, v.21, n.12, p.2881-2889, 1993.

KIRCHHOFF, S.; KROGER, A.; CRUZ, H.; TUMMLER, M.; SCHAPER, F.; KOSTER, M.; HAUSER, H. Regulation of cell growth by IRF-1 and BHK-21 cells. **Cytotechnology**, v.22, p.147-156, 1996.

KONDO, S.; SCHUTTE, B.C.; RICHARDSON, R.J.; BJORK, B.C.; KNIGHT, A.S.; WATANABE, Y.; HOWARD, E.; FERREIRA DE LIMA, R.L.; DAACK-HIRSCH, S.; SANDER, A.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; ZACKAI, E.H.; LAMMER, E.J.; AYLSWORTH, A.S.; ARDINGER, H.H.; LIDRAL, A.C.; POBER, B.R.; MORENO, L.; ARCOS-BURGOS, M.; VALENCIA, C.; HOUDAYER, C.; BAHUAU, M.; MORETTI-FERREIRA, D.; RICHIERI-COSTA, A.; DIXON, M.J.; MURRAY, J.C. Mutations in *IRF6* cause Van der Woude and Popliteal pterygium syndromes. **Nat. Genet.**, v.32, n.2, p.285-289, 2002.

KOTCH, L.E.; SULIK, K.K. Experimental fetal alcohol syndrome: proposed pathogenic basis for a variety of associated facial and brain anomalies. **Am. J. Med. Genet.**, v.44, p.168-176, 1992.

KRIENS, O. Documentation of cleft lip, alveolus, and palate. In: BARDACH, J.; MORRIS, H.L. (Eds.). **Multidisciplinary management of cleft lip and palate**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p.127-133.

KROMBERG, J.G.; JENKINS, T. Common birth defects in South African blacks. **S. Afr. Med. J.**, v.62, p.599-602, 1982.

KRUGLYAK, L.; DALY, M.; REEVE-DALY, M.; LANDER, E. Parametric and Nonparametric Linkage Analysis: a Unified Multipoint Approach. **Am. J. Hum. Genet.**, v.58, p.1347-1363, 1996.

LETTIERI, J. **Human malformations and related anomalies**. New York: Oxford University Press, 1993. p.367-374.

LIDRAL, A.C.; ROMITTI, P.A.; BASART, A.M.; DOETSCHMAN, T.; LEYSENS, N.J.; DAACK-HIRSCH, S.; SEMINA, E.V.; JOHNSON, L.R.; MACHIDA, J.; BURDS, A.; PARNELL, T.J.; RUBENSTEIN, J.L.R.; MURRAY, J.C. Association of *MSX1* and *TGFB3* with nonsyndromic clefting in humans. **Am. J. Hum. Genet.**, v.63, p.557-568, 1998.

LIDRAL, A.C.; MORENO, L.M. Progress towards discerning the genetics of cleft lip. **Curr. Opin. Pediatr.**, v.17, n.6, p.731-739, 2005.

LIEBLICH, J.M.; ROGOL, A.D.; WHITE, B.J.; ROSEN, S.W. Syndrome of anosmia with hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann syndrome): clinical and laboratory studies in 23 cases. **Am. J. Med.**, v.73, p.506-519, 1982.

LITTLE, J.; CARDY, A.; MUNGER, R.G. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. **Bull World Health Organ.**, v.82, n.3, p.213-218, 2004.

LIU, H.; HEATH, S.C.; SOBIN, C.; ROOS, J.L.; GALKE, B.L.; BLUNDELL, M.L.; LENANE, M.; ROBERTSON, B.; WIJSMAN, E.M.; RAPOPORT, J.L.; GOGOS, J.A.; KARAYIORGOU, M. Genetic variation at the 22q11 *PRODH2/DGCR6* locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.99, p.3717-3722, 2002.

LIU, W.; SUN, X.; BRAUT, A.; MISHINA, Y.; BEHRINGER, R.R.; MINA, M.; MARTIN, J.F. Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice. **Development**, v.132, n.6, p.1453-1461, 2005.

LOFFREDO, L.C.M.; SOUZA, J.M.P.; FREITAS, J.A.S.; MOSSEY, P.A. Oral clefts and vitamin supplementation. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.38, p.76-83, 2001.

LORENTE, C.; CORDIER, S.; GOUJARD, J.; SEGOLENE, A.; BIANCHI, F.; CALZOLARI, E.; DE WALLE, H.; KNILL-JONES, R. Occupational exposure and congenital malformation working group. Tobacco and alcohol use during pregnancy and risk of oral clefts. **Am. J. Public Health**, v.90, n.3, p.415-419, 2000.

LUETTEKE, N.C.; QIU, T.H.; PEIFFER, R.L.; OLIVER, P.; SMITHIES, O.; LEE, D.C. TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. **Cell**, v.73, p.263-278, 1993.

MACHIDA, J.; YOSHIURA, K.; FUNKHAUSER, C.D.; NATSUME, N.; KAWAI, T.; MURRAY, J.C. Transforming growth factor-alpha (*TGFA*): genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only. **Genomics**, v.61, n.3, p.237-242, 1999.

MAESTRI, N.E.; BEATY, T.H.; HETMANSKI, J.; SMITH, E.A.; McINTOSH, I.; WYSZYNSKI, D.F.; LIANG, K.Y.; DUFFY, D.L.; VANDERKOLK, C. Application

of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. **Am. J. Med. Genet.**, v.73, p.337-344, 1997.

MAMANE, Y.; HEYLBROECK, C.; GENIN, P.; ALGARTE, M.; SERVANT, M.J.; LEPAGE, C.; DELUCA, C.; KWON, H.; LIN, R.; HISCOTT, J. Interferon regulatory factors: the next generation. **Gene**, v.237, p.1-14, 1999.

MARCANO, A.C.B.; DOUDNEY, K.; BRAYBROOK, C.; SQUIRES, R.; PATTON, M.A.; LEES, M.M.; RICHIERI-COSTA, A.; LIDRAL, A.C.; MURRAY, J.C.; MOORE, G.E.; STANIER, P. TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate. **J. Med. Genet.**, v.41, p.68-74, 2004.

MARTINEZ-ALVAREZ, C.; TUDELA, C.; PEREZ-MIGUELSANZ, J.; O'KANE, S.; PUERTA, J.; FERGUSON, M. Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. **Dev. Biol.**, v.220, p.343-357, 2000.

METRAKOS, J.; METROKOS, K.; BAXTER, H. Clefts of the lip and palate in twins. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.22, n.2, p.109-122, 1958.

MILERAD, J.; LARSON, O.; HAGBERG, C.; IDEBERG, M. Associated malformations in infants with cleft lip and palate: a prospective, population-based study. **Pediatrics**, v.100, p.180-186, 1997.

MILLS, J.L.; KIRKE, P.N.; MOLLOY, A.M.; BURKE, H.; CONLEY, M.R.; LEE, Y.J.; MAYNE, P.D.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and oral clefts. **Am. J. Med. Genet.**, v.86, p.71-74, 1999.

MITCHELL, L.E.; RISCH, N. Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis. **Am. J. Hum. Genet.**, v.51, p.323-332, 1992.

MITCHELL, L.E.; RISCH, N. Correlates of genetic risk for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. **Clin. Genet.**, v.43, n.5, p.255-260, 1993.

MITCHELL, L.E.; BEATY, T.H.; LIDRAL, A.C. Guidelines for the design and analysis of studies on nonsyndromic cleft lip and cleft palate in humans: summary report from a workshop of the international consortium for oral clefts genetics. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.39, n.1, p.93-100, 2002

MOLSTED, K.; KJAER, I.; GIWERCMAN, A.; VESTERHAUGE, S.; SKAKKEBAEK, N.E. Craniofacial morphology in patients with Kallmann's syndrome with and without cleft lip and palate. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.34, p.417-424, 1997.

MOORE, K.; PERSAUD, T. **Before we are born: essentials of embryology and birth defects.** Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1990. 530 p.

MOORE, K.L. **Embriologia básica**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1993. p.142-149.

MORENO, L.M.; ARCOS-BURGOS, M.; MARAZITA, M.L.; KRAHN, K.; MAHER, B.S.; COOPER, M.E.; VALENCIA-RAMIREZ, C.R.; LIDRAL, A.C. Genetic analysis of candidate loci in non-syndromic cleft lip families from Antioquia-Colombia and Ohio. **Am. J. Med. Genet. A**, v.125, n.2, p.135-144, 2004.

MOSSEY, P.; LITTLE, J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: WYSZYNSKI, D.F. **Cleft lip and palate: from origin to treatment**. New York: Oxford University Press, 2002. p.127-158.

MUNGER, R.G.; ROMITTA, P.A.; DAACK-HIRSCH, S.; BURNS, T.L.; MURRAY, J.C.; HANSON, J. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. **Teratology**, v.54, p.27-33, 1996.

MURRAY, J.C. Face facts: genes, environment, and clefts. **Am. J. Hum. Genet.**, v.57, p.227-232, 1995.

MURRAY, J.C.; DAACK-HIRSCH, S.; BUETOW, K.H.; MUNGER, R.; ESPINA, L.; PAGLINAWAN, N.; VILLANUEVA, E.; RARY, J.; MAGEE, K.; MAGEE, W. Clinical and epidemiological studies of cleft lip and palate in the Philippines. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.34, p.7-10, 1997.

MURRAY, J.C. Genes and environment, non-syndromic cleft lip and palate. **Presidential Lecture**, 2000.

MURRAY, J.C. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. **Clin. Genet.**, v.61, p.248-256, 2002.

NOPOULOS, P.; BERG, S.; VANDEMARK, D.; RICHMAN, L.; CANADY, J.; ANDREASEN, N.C. Cognitive dysfunction in adult males with non-syndromic clefts of the lip and/or palate. **Neuropsychologia**, v.40, n.12, p.2178-2184, 2002.

OHBAYASHI, N.; SHIBAYAMA, M.; KUROTAKI, Y.; IMANISHI, M.; FUJIMORI, T.; ITOH, N.; TAKADA, S. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. **Genes Dev.**, v.16, p.870-879, 2002.

ORNITZ, D.M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol.**, v.2, p.1-12, 2001,

OWENS, J.R. Epidemiology of facial clefting. **Arch. Dis. Childh.**, v.60, p.521-524, 1985.

PARADISE, J.L.; BLUESTONE, C.D. Diagnosis and management of ear disease in cleft palate infants. **Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.**, v.73, n.4, p.709-714, 1969.

PENROSE, L.S. The general purpose sibpair linkage test. **Ann. Eugen.**, v.18, n.2, p.120-124, 1953.

PETERS, H.; BALLING, R. Teeth. Where and how to make them. **Trends Genet.**, v.15, n.2, p.59-65, 1999.

PETERS, H.; NEUBUSER, A.; KRATOCHWIL, K.; BALLING, R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. **Genes Dev.**, v.12, p.2735-2747, 1999.

PITTELOUD, N.; ACIERNO, J.S. JR.; MEYSING, A.U.; DWYER, A.A.; HAYES, F.J.; CROWLEY JR., W.F. Reversible kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.90, p.1317-1322, 2005.

PRESCOTT, N.J.; WINTER, R.M.; MALCOLM, S. Nonsyndromic cleft lip and palate: complex genetics and environmental effects. **Ann. Hum. Genet.**, v.65, p.505-515, 2001.

PROETZEL, G.; PAWLOWSKI, A.S.; WILES, M.V.; YIN, M.; BOIVIN, G.P.; HOWLES, P.N.; DING, J. Transforming growth factor-B3 is required for secondary palate fusion. **Nat. Genet.**, v.11, p.409-414, 1995.

RICE, R.; SPENCER-DENE, B.; CONNOR, E.C.; GRITLI-LINDE, A.; MCMAHON, A.P.; DICKSON, C.; THESLEFF, I.; RICE, D.P. **J. Clin. Invest.**, v.113, p.1692-1700, 2004.

RILEY, B.M.; MANSILLA, M.A.; MA, J.; DAACK-HIRSCH, S.; MAHER, B.S.; RAFFENSPERGER, L.M.; RUSSO, E.T.; VIEIRA, A.R.; DODE, C.; MOHAMMADI, M.; MARAZITA, M.L.; MURRAY, J.C. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.104, n.11, p.4512-4517, 2007.

RILEY, B.M.; SCHULTZ, R.E.; COOPER, M.E.; GOLDSTEIN-MCHENRY, T.; DAACK-HIRSCH, S.; LEE, K.T.; DRAGAN, E.; VIEIRA, A.R.; LIDRAL, A.C.; MARAZITA, M.L.; MURRAY, J.C. A genome-wide linkage scan for cleft lip and cleft palate identifies a novel locus on 8p11-23. **Am. J. Med. Genet. A**, v.143, n.8, p.846-852, 2007.

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 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.

SAAL, H.M. Syndromes and malformations associated with cleft lip with or without cleft palate. **Am. J. Hum. Genet.**, v.64, p.A118, 1998.

SAAL, H.M. A prospective analysis of cleft palate: associated syndromes and malformations. In: DAVID, W. SMITH WORKSHOP ON MORPHOGENESIS

AND MALFORMATIONS, 31., 2000, San Diego. **Proceedings.** San Diego, 2000.

SANFORD, L.P.; ORMSBY, I.; GITTENBERGER-DE GROOT, A.C.; SARIOLA, H.; FRIEDMAN, R.; BOIVIN, G.P.; CARDELL, E.L.; DOETSCHMAN, T. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. **Development**, v.124, n.13, p.2659-2670, 1997.

SASSANI, R.; BARLETT, S.P.; FENG, H.; GOLDNER-SAUVER, A.; HAQ, A.K.; BUETOW, K.H.; GASSER, D.L. Association between alleles of the transforming growth factor alpha locus and the occurrence of cleft lip. **Am. J. Med. Genet.**, v.45, p.565-569, 1993.

SATO, F.; NATSUME, N.; MACHIDO, J.; SUZUKI, S.; KAWAI, T. Association between transforming growth factor beta 3 and cleft lip and/or palate in the Japanese population. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.107, n.7, p.1909-1910, 2001.

SATO, N.; KATSUMATA, N.; KAGAMI, M.; HASEGAWA, T.; HORI, N.; KAWAKITA, S.; MINOWADA, S.; SHIMOTSUKA, A.; SHISHIBA, Y.; YOKOZAWA, M.; YASUDA, T.; NAGASAKI, K.; HASEGAWA, D.; HASEGAWA, Y.; TACHIBANA, K.; NAIKI, Y.; HORIKAWA, R.; TANAKA, T.; OGATA, T. Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.89, p.1079-1088, 2004.

SATO, N.; HASEGAWA, T.; HORI, N.; FUKAMI, M.; YOSHIMURA, Y.; OGATA, T. Gonadotrophin therapy in Kallmann syndrome caused by heterozygous mutations of the gene for fibroblast growth factor receptor 1: report of three families: case report. **Hum. Reprod.**, v.20, p.2173-2178, 2005.

SATOKATA, I.; MAAS, R. *MSX1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. **Nat. Genet.**, v.6, p.348-353, 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.

SCHLIEKELMAN, P.; SLATKIN, M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. **Am. J. Hum. Genet.**, v.71, p.1369-1385, 2002.

SCHULTZ, R.E.; COOPER, M.E.; DAACK-HIRSCH, S.; SHI, M.; NEPOMUCENA, B.; GRAF, K.A.; O'BRIEN, E.K.; O'BRIEN, S.E.; MARAZITA, M.L.; MURRAY, J.C. A targeted scan of fifteen regions for nonsyndromic cleft lip and palate in Filipino families. **Am. J. Med. Genet.**, v.125, n.1, p.17-22, 2004.

SHAW, G.M.; LAMMER, E.J.; WASSERMAN, C.R.; O'MALLEY, C.D.; TOLAROVA, M.M. Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid preconceptionally. **Lancet**, v.346, p.393-396, 1995.

SHAW, G.M.; WASSERMAN, C.R.; LAMMER, E.J.; O'MALLEY, C.D.; MURRAY, J.C.; BASART, A.M.; TOLAROVA, M.M. Orofacial clefts, parental cigarette smoking and transforming growth factor-alpha gene variants. **Am. J. Hum. Genet.**, v.58, p.551-561, 1996.

SHI, M. **Comprehensive gene environment analysis of the causes of orofacial clefts**. Iowa: University of Iowa, 2005.

SHIONO, P.; KLEBANOFF, M.; BERENDES, H. Congenital Malformations and Maternal Smoking During Pregnancy. **Teratology**, v.34, p.65-71, 1986.

SILVA, A.L.; RIBEIRO, L.A.; COOPER, M.E.; MARAZITA, M.L.; MORETTI-FERREIRA, D. Transmission analysis of candidate genes for nonsyndromic oral clefts in Brazilian parent-child triads with recurrence. **Genet. Mol. Biol.**, v.9, n.3, p.439-442, 2006.

SOZEN, M.; SUZUKI, K.; TOLAROVA, M.; BUSTOS, T. IGLESIAS, J.; SPRITZ, R. A nonsense mutation of PVRL1 (W185X) is associated with non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. **Nat. Genet.**, v.29, p.141-142, 2001.

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

STARK, R.B. Pathogenesis of harelip and cleft palate. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.13, p.20-39, 1954.

STOLL, C.; QUIAN, J.F.; FEINGOLD, J.; SAUVAGE, P.; MAY, E. Genetic variation in transforming growth factor alpha: possible association of BamHI polymorphism with bilateral sporadic cleft lip and palate. **Am. J. Hum. Genet.**, v.50, p.870-871, 1992.

STOLL, C.; ALEMBIK, Y.; DOTT, B.; ROTH, M.P. Associated malformations in cases with oral clefts. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.37, p.41-47, 2000.

STRACHAN, T.; READ, A.P. **Human molecular genetics**. 2.ed. New York: John Wiley and Sons, 1999. 576 p.

SUZUKI, Y.; JEZEWSKI, P.A.; MACHIDA, J.; WATANABE, Y.; SHI, M.; COOPER, M.E.; VIET LE, T.; NGUYEN, T.D.; HAI, H.; NATSUME, N.; SHIMOZATO, K.; MARAZITA, M.L.; MURRAY, J.C. In a Vietnamese population, *MSX1* variants contribute to cleft lip and palate. **Genet. Med.**, v.6, p.117-125, 2004.

TAKAHARA, S.; TAKIGAWA, T.; SHIOTA, K. Programmed cell death is not a necessary prerequisite for fusion of the mouse palate. **Int. J. Dev. Biol.**, v.48, p.39-46, 2004.

TANABE, A.; TAKETANI, S.; ENDO-ICHIKAWA, Y.; TOKUNAGA, R.; OGAWA, Y.; HIRAMOTO, M. Analysis of the candidate genes responsible for non-syndromic cleft lip and palate in Japanese people. **Clin. Sci.**, v.99, p.105-111, 2000.

TANIGUCHI, T.; LAMPHIER, M.S.; TANAKA, N. IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1333, n.1, p.M9-M17, 1997.

THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. The International HapMap Project. **Nature**, v.426, p.789-796, 2003.

THESLEFF, I. Two genes for missing teeth. **Nat. Genet.**, v.13, p.379-380, 1996.

THOMAS, B.L.; LIU, J.K.; RUBENSTEIN, J.L.; SHARPE, P.T. Independent regulation of Dlx2 expression in the epithelium and mesenchyme of the first branchial arch. **Development**, v.127, n.2, p.217-224, 2000.

TOLAROVA, M. Orofacial clefts in Czechoslovakia. Incidence, genetics and prevention of cleft lip and palate over a 19 year period. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, v.21, p.19-25, 1987.

TOLAROVA, M.; HARRIS, J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamin. **Teratology**, v.51, p.71-78, 1995.

TOLAROVA, M.M.; CERVENKA, J. Classification and birth prevalence of orofacial cleft. **Am. J. Med. Genet.**, v.75, p.42-47, 1998.

TOMPACH, P.C.; ZEITLER, D.L. Kallmann syndrome with associated cleft lip and palate: Case report and review of the literature. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.53, p.85-87, 1995.

TROKOVIC, N.; TROKOVIC, R.; MAI, P.; PARTANEN, J. **Genes Dev.**, v.17, p.141-153, 2003.

VAINIO, S.; KARAVANOVA, I.; JOWETT, A.; THESLEFF, I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. **Cell**, v.75, n.1, p.45-58, 1993.

VAN DEN BOOGAARD, M.J.H.; DORLAND, M.; BEEMER, F.A.; VAN AMSTEL, H.K.P. *MSX1* mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. **Nat. Genet.**, v.24, p.342-343, 2000.

VASTARDIS, H.; KARIMBUX, N.; GUTHUA, S.W.; SEIDMAN, J.G.; SEIDMAN, C.E. A human *MSX1* homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. **Nat. Genet.**, v.13, p.417-421, 1996.

VERMEULEN, S.; MESSIAEN, L.; SCHEIR, P.; DE BIE, S.; SPELEMAN, F.; DE PAEPE, A. Kallmann syndrome in a patient with congenital spherocytosis and an interstitial 8p11.2 deletion. **Am. J. Med. Genet.**, v.108, p.315-318, 2002.

VIEIRA, A.R.; ROMITTI, P.A.; ORIOLI, I.M.; CASTILLA, E.E. Complex segregation analysis of 1.792 cleft lip and palate families in South America: 1967-1997. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v.17, n.2, p.161-165, 2003a.

VIEIRA, A.R.; ROMITTI, P.A.; ORIOLI, I.M.; CASTILLA, E.E. Inheritance of cleft palate in South América: evidence for a major locus recessive. **Orthod. Craniofac. Res.**, v.6, p.83-87, 2003b.

VIEIRA, A.R.; AVILA, J.R.; DAACK-HIRSCH, S.; DRAGAN, E.; FELIX, T.M.; RAHIMOV, F.; HARRINGTON, J.; SCHULTZ, R.R.; WATANABE, Y.; JOHNSON, M.; FANG, J.; O'BRIEN, S.E.; ORIOLI, I.M.; CASTILLA, E.E.; FITZPATRICK, D.R.; JIANG, R.; MARAZITA, M.L.; MURRAY, J.C. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. **PLoS Genet.**, v.1, n.6, p.e64, 2005.

VINTINER, G.M.; HOLDER, S.E.; WINTER, R.M.; MALCOLM, S. No evidence of linkage between the transforming growth factor alpha gene in families with

apparently autosomal dominant inheritance of cleft lip and palate. **J. Med. Genet.**, v.29, p. 393-397, 1992.

WANG, Y.; SASSOON, D. Ectoderm-mesenchyme and mesenchyme-mesenchyme interactions regulate *MSX1* expression and cellular differentiation in the murine limb bud. **Dev. Biol.**, v.168, p.374-382, 1995.

WATANABE, A.; AKITA, S.; TIN, N.T.; NATSUME, N.; NAKANO, Y.; NIIKAWA, N.; UCHIYAMA, T.; YOSHIURA, K. A mutation in RYK is a genetic factor for nonsyndromic cleft lip and palate. **Cleft Palate Craniofac. J.**, v.43, n.3, p.310-316, 2006.

WARRINGTON, A.; VIEIRA, A.R.; CHRISTENSEN, K.; ORIOLI, I.M.; CASTILLA, E.E.; ROMITTI, P.A.; MURRAY, J.C. Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. **J. Med. Genet.**, v.43, n.6, p.e26, 2006.

WARKANY, J.; NELSON, R.C.; SCHRAFFENBERGER, E. Congenital malformations induced in rats by maternal nutritional deficiency. **Am. J. Dis. Child.**, v.65, p.882-894, 1943.

WEINBERG, C.R. Allowing for missing parents in genetics studies of case-parent triads. **Am. J. Hum. Genet.**, v.64, p.1186-1193, 1999.

WERLER, M.; LAMMER, E.; ROSENBERG, L.; MITCHELL, A. Maternal cigarette smoking during pregnancy in relation to oral clefts. **Am. J. Epidemiol.**, v.132, n.5, p.926-932, 1990.

WHITE, B.J.; ROGOL, A.D.; BROWN, K.S.; LIEBLICH, J.M.; ROSEN, S.W. The syndrome of anosmia with hypogonadotropic hypogonadism: a genetic study of 18 new families and a review. **Am. J. Med. Genet.**, v.15, p.417-435, 1983.

WYSZYNSKI, D.F.; DIEHL, S.R. Infant C677T mutation in MTHFR: maternal periconceptional vitamin use, and risk of nonsyndromic cleft lip. **Am. J. Med. Genet.**, v.92, p.79-80, 2000.

WYSZYNSKI, D.F. **Cleft lip and palate**. New York: Oxford University Press, 2002. p. 5-13.

ZANNINI, M.; AVANTAGGIATO, V.; BIFFALI, E.; ARNONE, M.I.; SATO, K.; PISCHETOLA, M.; TAYLOR, B.A.; PHILLIPS, S.J.; SIMEONE, A.; DI LAURO, R. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. **EMBO J.**, v.20, n.8, p.2108, 2001.

ZENATY, D.; BRETONES, P.; LAMBE, C.; GUEMAS, I.; DAVID, M.; LEGER, J.; DE ROUX, N. Pediatric phenotype of kallmann syndrome due to mutations of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1). **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.254-255, p.78-83, 2006.

ZUCCHERO, T.M.; COOPER, M.E.; MAHER, B.S.; HIRSCH, S.D.; NEPOMUCENO, R.N.; RIBEIRO, L.A.; CAPRAU, D.; CHRISTENSEN, K.; SUZUKI, Y.; MACHIDA, J.; NATSUME, N.; YOSHIURA, K.; VIEIRA, A.R.; ORIOLO, I.M.; CASTILLA, E.E.; MORENO, L.; ARCOS-BURGOS, M.; LIDRAL, A.C.; FIELD, L.L.; LIU, Y.; RAY, A.; GOLDSTEIN, T.H.; SCHULTZ, R.E.; SHI, M.; KONDO, S.; SCHUTTE, B.C.; MARAZITA, M.L.; MURRAY, J.C. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. **N. Engl. J. Med.**, v.351, n.8, p.769-780, 2004.

ZHANG, H.; HU, G.; WANG, H.; SCIAVOLINO, P.; ILER, N.; SHEN, M.; ABATE-SHEN, C. Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. **Mol. Cell. Biol.**, v.17, n.5, p.2920-2932, 1997.

ANEXO I - Termo de consentimento livre e esclarecido

CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____
portador do RG de nº _____ residente à Rua (Av.)
_____, nº _____, na cidade de
_____, Estado de _____, responsável pelo (a)
menor _____
matriculado no HRAC com o nº _____, concordo em participar (autorizo sua
participação) na pesquisa de Título: **“Análise de genes candidatos para fissuras orais não síndrômicas
em famílias com recorrência”**, realizada pela pesquisadora Aline Lourenço da Silva, sob a orientação do
Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira.

A referida pesquisa tem por objetivo:

1. Realizar análise de segregação para verificar associação entre esses genes e as fissuras orais não síndrômicas.
2. Seqüenciamento de genes candidatos no intuito de identificar mutações ou variações gênicas no grupo estudado.
3. Compara os resultados obtidos com os já publicados na literatura.

e fui orientado do seguinte:

1. Serão coletados 3ml de sangue do paciente e seus pais.
2. A coleta de sangue pode causar algum desconforto físico e existe uma chance de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta.
3. Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você ou sua família.
4. Vocês estarão colaborando para aumentar o nosso conhecimento sobre as possíveis causas das fissuras orais não síndrômicas.
5. Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos.
6. Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulem entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área.
7. Sempre que ocorrerem publicações científicas a identidade do paciente será mantida em absoluto sigilo.
8. Todos os resultados de exames moleculares estarão disponíveis no prontuário do paciente no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (Centrinho).
9. Caso queira apresentar reclamações em relação à participação na pesquisa, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC-USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 na Unidade de Ensino e Pesquisa ou pelo telefone (14) 3235-8421

Estou ciente também de que minha participação é voluntária e dela posso desistir a qualquer momento, sem explicar os motivos e sem comprometer meu tratamento no HRAC.

Bauru, ____/____/____

Assinatura do Paciente (Responsável)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa da **CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica ou Art. 29º do Código de Ética do Fonoaudiólogo).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de .

Paciente (Responsável)

Pesquisador(a) responsável

ANEXO II - Termo de consentimento livre e esclarecido - controle

CARTA DE INFORMAÇÃO
(GRUPO CONTROLE)

Eu, _____
portador do RG de nº _____ residente à Rua (Av.) _____, nº _____, na cidade de _____, Estado de _____, responsável pelo (a) menor _____

_____, concordo em participar (autorizo sua participação) do grupo controle na pesquisa de Título: **“Análise de genes candidatos para fissuras orais não síndrômicas em famílias com recorrência”**, realizada pela pesquisadora Aline Lourenço da Silva, sob a orientação do Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira.

A referida pesquisa tem por objetivo:

4. Realizar análise de segregação para verificar associação entre esses genes e as fissuras orais não síndrômicas.
5. Seqüenciamento de genes candidatos no intuito de identificar mutações ou variações gênicas no grupo estudado.
6. Compara os resultados obtidos com os já publicados na literatura.

e fui orientado do seguinte:

6. Será utilizado o material já coletado anteriormente.
7. Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você ou sua família.
8. Vocês estarão colaborando para aumentar o nosso conhecimento sobre as possíveis causas das fissuras orais não síndrômicas.
9. Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos.
- 6 Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulem entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área.
- 7 Sempre que ocorrerem publicações científicas a identidade do paciente será mantida em absoluto sigilo.
- 8 Caso queira apresentar reclamações em relação à participação na pesquisa, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC-USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 na Unidade de Ensino e Pesquisa ou pelo telefone (14) 3235-8421

Estou ciente também de que minha participação é voluntária e dela posso desistir a qualquer momento.

Bauri, ___/___/___

Assinatura do Paciente (Responsável)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(GRUPO CONTROLE)**

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa da **CARTA DE INFORMAÇÃO (GRUPO CONTROLE)**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar do grupo controle da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica ou Art. 29º do Código de Ética do Fonoaudiólogo).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de .

Paciente (Responsável)

Pesquisador(a) responsável

CARTA AO PACIENTE

Estamos convidando vocês a participarem do grupo controle do projeto de pesquisa do **Serviço de Aconselhamento Genético – UNESP – Botucatu e do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – Centrinho – USP/Bauru** intitulado “Análise de genes candidatos para fissuras orais não sindrômicas em famílias com recorrência” desenvolvido pela pesquisadora Aline Lourenço da Silva.

Sabendo que a senhora já participou de um dos nossos projetos anteriores gostaríamos de convidá-la a participar de mais este trabalho. Agradecemos desde já sua colaboração, ela é muito importante para nós.

Para participar não será necessária nenhuma consulta ou exame, pois já foi feita uma coleta de sangue da senhora e de seu(sua) filho(a) para o projeto que vocês participaram anteriormente e será utilizado este mesmo material. Será necessário apenas que a senhora leia atentamente os documentos enviados, assine-os e nos devolva pelo correio. Para tanto estamos enviando um envelope já selado juntamente com os documentos, será necessário apenas que a senhora assine os documentos, coloque-os neste envelope e nos envie pelo correio o mais rápido possível.

Qualquer dúvida quanto à pesquisa ou mesmo para averiguar a veracidade do projeto em questão entrem em contato comigo pelo telefone (14) 3235-8412 das 8:00 às 12:00 ou das 14:00 às 18:00 ou pelo email alinelsilva@yahoo.com.br e terei prazer em atendê-los.

Mais uma vez agradeço a colaboração, sua participação é muito importante para este projeto.

Atenciosamente,

Aline Lourenço da Silva
(Pesquisadora Responsável)

ANEXO III - Autorização do CONEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 514/2006

Registro CONEP: 12224 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 1882/2005

Processo nº 25000.119176/2005-88

Projeto de Pesquisa: *"Análise de genes candidatos para fissuras orais não sindrômicas em família com recorrência"*.

Pesquisador Responsável: Dra. Aline Lourenço da Silva

Instituição: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais/USP-Bauru, CEP da Faculdade de Medicina de Botucatu/SP.

Área Temática Especial: Genética humana

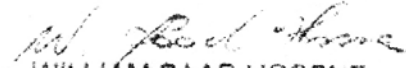
Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1947/2005, cabem as seguintes considerações:

- a) A pesquisadora fez alterações no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido atendendo satisfatoriamente as recomendações solicitadas.
- b) O Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada aprovou o projeto

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 16 de maio de 2006


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS