



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - ESTOMATOLOGIA**

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA REGIÃO 8q24 (rs987525 e rs1530300) E NO  
GENE *ABCA4* (rs560426) EM PORTADORES DE FISSURAS LABIAIS E  
LABIOPALATINAS NÃO- SINDRÔMICAS**

**ANDRÉA DO REGO BORGES**

**SALVADOR- BA**

**2013**

**ANDRÉA DO REGO BORGES**

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA REGIÃO 8q24 (rs987525 e rs1530300) E NO  
GENE *ABCA4* (rs560426) EM PORTADORES DE FISSURAS LABIAIS E  
LABIOPALATINAS NÃO- SINDRÔMICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Estomatologia.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Regina de Almeida Reis**

**SALVADOR**

**2013**

**ANDRÉA DO REGO BORGES**

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA REGIÃO 8q24 (rs987525 e rs1530300) E NO  
GENE *ABACA4* (rs560426) EM PORTADORES DE FISSURAS LABIAIS E  
LABIOPALATINAS NÃO- SINDRÔMICAS**

Comissão Julgadora

Membros titulares

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Regina de Almeida Reis - Orientadora  
Doutora em Patologia  
Professora Adjunto do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof. Dr. Ricardo Della Coletta  
Doutor em Patologia Buco-Dental  
Professor Associado do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Manoela Carrera Martinez Cavalcante Pereira  
Doutora em Estomatopatologia  
Professora do Curso de Odontologia da União Metropolitana de Educação e Cultura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Santos Tunes  
Doutora em Clínica Odontológica  
Professora Adjunta do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Membro suplente

Prof. Dr. Urbino da Rocha Tunes  
Doutor em Imunologia  
Professor Titular do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

**SALVADOR  
2013**

**INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS:**

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**

**UNIVERSIDADES ESTADUAL DE CAMPINAS**

**HOSPITAL SANTO ANTÔNIO/OBRAS SOCIAIS IRMÃ DULCE**

**HOSPITAL MARTAGÃO GESTEIRA**

**Dedico esta dissertação de mestrado  
à todos aqueles que me  
auxiliaram para a realização deste  
trabalho**

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço a Deus, por orientar meus passos e pela constante presença em minha vida;**

**Aos meus pais, pela dedicação e apoio sempre presente em minhas escolhas.**

**Ao meu noivo Uadson pela compreensão, apoio e paciência.**

**À orientadora Profa. Dra. Silvia Regina de Almeida Reis pela confiança, oportunidade e ensinamentos transmitidos neste grande projeto.**

**Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta pela oportunidade que nos foi oferecida em Piracicaba- São Paulo.**

**Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano pelo fomento do mestrado, possibilitando a concretização de mais uma etapa da minha vida profissional.**

**Às professoras Alena Medrado e Patrícia Veiga pela colaboração e disponibilidade durante a pesquisa.**

**Ao colega de mestrado Ryuichi Hoshi pela grande colaboração e parceria durante a pesquisa.**

**Aos colegas do grupo de pesquisa pelo auxílio na obtenção das amostras de saliva.**

**À colega Dra. Sibeles Nascimento de Aquino pelo processamento das amostras e colaboração durante toda a pesquisa.**

**Aos colegas da turma por tornarem essa caminhada mais prazerosa, pelo aprendizado, amizade e por fazerem parte da minha formação.**

**Aos pacientes, familiares e voluntários que se dispuseram a participar desta pesquisa.**

**À Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, ao Hospital Santo Antônio e à Universidade Estadual de Campinas que possibilitaram a realização deste projeto.**

**Obrigada a todos.**

*“A persistência é o menor caminho do  
êxito”*

*Charles Chaplin*

## LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

*ABCA4*: ATP-Binding Cassette, subfamily A, member 4 (membro da superfamília ATP-ligante à fita transportadora, subfamília A, membro 4)  
AIM: Painéis informativos de ancestralidade  
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa  
DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)  
EBMSP: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública  
ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay  
EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilendiamino tetra acético)  
FL: Fissura labial  
FL/P: Fissura labial e/ou palatina  
FL/PNS: Fissura labial e/ou palatina não sindrômica  
*FOXE1*: *Forkhead box E1* (gene da família de fatores de transcrição tireoidianos)  
FP: Fissura Palatina  
GWAS: Estudo de associação de larga escala genômica  
HCl: Ácido Clorídrico  
IRF6: Interferon regulatory factor 6 (Fator regulador de interferon 6)  
IC: Intervalo de confiança  
INDEL: Painel de marcadores de inserção e deleção  
M: Mol  
*MAFB*: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B  
MDR: Multi-Drug Resistance  
*MTHFD1*: Metilenotetrahydrofolato desidrogenase 1 (Metilenotetrahydrofolato desidrogenase 1)  
*MTHFR*: 5, 10-Metilenotetrahydrofolato redutase (5,10-Metilenotetrahydrofolato redutase)  
*MTR*: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (5-metiltetrahydrofolato homocisteína metiltransferase)  
*MSX*: *Muscle Segment Homeobox* (gene homeótipo do segmento muscular)  
mM: Milimolar  
Mg: Miligrama  
ml: Mililitro  
*MAFB*: *V-MAF Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Family, protein B* (gene relacionado à regulação da hematopoiese linhagem-específica em células mielóides)  
µl: Microlitro  
ng: Nanograma  
NaCl: Cloreto de sódio  
OR: Odds ratio (Risco de recorrência)  
OASID: Obras Assistenciais Irmã Dulce  
PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)  
pH: Potencial de Hidrogênio  
qsp: Quantidade suficiente para  
®: Marca registrada  
SNP: Single nucleotide polymorphisms  
*TGF-β3*: *Transforming growth factor beta 3*  
UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	08
APRESENTAÇÃO.....	10
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
MANUSCRITO I.....	13
RESUMO.....	14
2. INTRODUÇÃO.....	15
3. REVISÃO DISCUTIDA DA LITERATURA.....	16
3.1.Fissura labial e/ou palatina não sindrômica.....	16
3.2. Epidemiologia e fatores ambientais.....	19
3.3. Fatores genéticos.....	21
3.4. Genes candidatos e polimorfismos genéticos.....	22
3.5. Ancestralidade.....	24
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
<i>ABSTRACT</i> .....	28
REFERÊNCIAS (R).....	29
MANUSCRITO II.....	36
RESUMO.....	37
5. INTRODUÇÃO.....	38
6. METODOLOGIA.....	39
6.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	39
6.2. População.....	39
6.3. Coleta das amostras para análise dos polimorfismos.....	39
6.4. Isolamento do DNA.....	40
6.5. Seleção dos polimorfismos.....	40
6.6. Genotipagem.....	41
6.7. Ancestralidade.....	42
6.8. Análise estatística.....	43
7. RESULTADOS.....	44
7.1. Características Gerais dos Grupos.....	44
7.2. Ancestralidade.....	44
7.3. Frequência Alélica e Genotípica dos polimorfismos.....	45
8. DISCUSSÃO .....	50
9. CONCLUSÕES .....	53
<i>ABSTRACT</i> .....	55
REFERÊNCIAS (P).....	56
ANEXO 1.....	59

## **APRESENTAÇÃO**

Este trabalho consiste em uma dissertação de mestrado na área de concentração em Estomatologia, apresentado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. A pesquisa é iniciada com uma revisão da literatura sobre as fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas, cujos aspectos embriológicos, epidemiológicos e genéticos estão descritos no manuscrito I. Já o manuscrito II avaliou, por meio de um estudo caso-controle, a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos rs987525, rs1530300, rs560426 em pacientes portadores de FL/PNS e indivíduos clinicamente normais.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As fissuras de lábio e/ou palato (FL/P) estão entre as alterações congênitas mais frequentes e representam as malformações mais comuns na região craniofacial. Estas alterações acontecem durante a embriogênese. No lábio, ocorrem entre a 4<sup>a</sup> e a 7<sup>a</sup> semana de gestação, já no palato, entre a 8<sup>a</sup> e a 12<sup>a</sup> semana de vida intrauterina<sup>R9,P1,P2</sup>.

Os fatores de risco associados às fissuras envolvem aspectos de natureza ambiental e genética, o que torna complexo os estudos envolvendo a etiologia dessas alterações. Entre os aspectos ambientais podem ser citados o tabagismo e etilismo durante a gestação, uso de anticonvulsivantes e deficiência vitamínica<sup>R5</sup>.

Em relação aos fatores genéticos, inúmeros estudos que demonstram genes candidatos e polimorfismos associados às FL/PNS já foram desenvolvidos. Dentre as abordagens utilizadas nessas pesquisas estão a análise de associação e de ligação genética de pares de irmãos<sup>R43,R47</sup>.

Novos polimorfismos e regiões cromossômicas têm sido pesquisadas nos últimos anos. Beaty *et al.* (2010) desenvolveram um estudo de associação genômica global com trios de casos parentais de fendas labiais e/ou palatinas não sindrômicas (FL/PNS) e identificaram dois novos genes associadas às FL/P, o *MAFB* (polimorfismo rs13041247) e *ABCA4* (polimorfismo rs560426)<sup>R68, P10</sup>. Além disso, verificaram também forte associação para o polimorfismo rs987525 no locus 8q24, uma região que também tem sido associada à FL/PNS em pesquisas recentes<sup>R60, P9</sup>. Entretanto, alguns genes e *loci* encontrados nestes estudos não foram replicados em diferentes populações. Um dos fatores que pode influenciar na discordância com os resultados dos estudos de larga escala genômica é a composição étnica populacional, principalmente em países com histórico recente de miscigenação. No Brasil, este fator pode ter uma influência importante, já que sua colonização foi caracterizada por diferentes grupos de imigrantes<sup>R79,R80,R84</sup>.

No Brasil, alguns estudos de replicação envolvendo os polimorfismos rs560426, no gene *ABCA4*, rs987525 e rs1530300, ambos pertencentes ao locus 8q24, já foram realizados. Brito *et al.* (2012) avaliaram grupos de diferentes regiões brasileiras, a saber do Rio de Janeiro, Fortaleza, Maceió, Santarém e Barbalha e sul de Minas Gerais<sup>R72, P9</sup>. Esses polimorfismos

ainda não foram pesquisados no estado da Bahia, que apresenta uma população miscigenada, com grande influência da colonização africana. Esclarecer nesta população se esses polimorfismos são marcadores de risco para a ocorrência de fissuras torna-se relevante na pesquisa dessas anomalias, já que diferenças étnicas podem contribuir para discordâncias entre estudos.

R: referente a citações das referências do manuscrito 1

P: referente a citações das referências do manuscrito 2

**MANUSCRITO I**

**FISSURAS LABIAIS E/OU PALATINAS NÃO SINDRÔMICAS: REVISÃO DE  
LITERATURA**

## RESUMO

As fendas labiais, labiopalatinas e palatinas são anomalias craniofaciais resultantes de defeitos na fusão dos processos craniofaciais. Estas alterações apresentam uma incidência variada e são mais comuns na forma não sindrômica. Este manuscrito tem como objetivo a realização de uma revisão da literatura sobre as fendas labiais e/ou palatinas não sindrômicas, com ênfase nos aspectos genéticos. Efetuou-se uma busca de artigos em bases de dados computadorizadas, como Medline, Lilacs e Pub Med. A seleção inicial de estudos potenciais foi determinada pela leitura dos títulos e resumos de cada artigo identificado. A seleção final dos artigos foi realizada pelos autores depois da obtenção e leitura dos artigos completos. Segundo a análise crítica dos artigos selecionados, observou-se que diversos genes e regiões cromossômicas foram associados às fendas orofaciais em estudos de larga associação genômica, a exemplo do *IRF6*, *ABCA4*, *MAFB* e região 8q24. Verificou-se que a etiologia das fissuras é multifatorial, com envolvimento de fatores ambientais e genéticos. Observou-se também forte interferência de fatores étnicos, principalmente em estudos do tipo caso-controle. Alguns polimorfismos identificados em estudos GWAS foram replicados e associados à população brasileira de fissurados, a exemplo dos polimorfismos rs987525, rs1530300 e rs560426. A etiologia das FL/PNS é multifatorial com forte interferência de fatores étnicos, por isso ultimamente, o estudo da ancestralidade genômica tem sido incorporado às pesquisas que associam os polimorfismos genéticos às fissuras.

Palavras-chave: Polimorfismo genético, fenda labial, fenda palatina.

## 2. INTRODUÇÃO

As fendas labiais (FL), labiopalatinas (FLP) e palatinas (FP) são anomalias craniofaciais de etiologia multifatorial, resultantes de defeitos na fusão dos processos craniofaciais<sup>1</sup>. A maioria dos indivíduos portadores dessas anomalias apresenta a forma não sindrômica (FL/PNS), cujas fendas não estão associadas a outras malformações e nem a alterações comportamentais ou cognitivas. Na forma sindrômica, menos comum, as fissuras estão associadas a outras anomalias, a exemplo da síndrome de Van der Woude, caracterizada pela presença de FL/P e de fossetas labiais<sup>2</sup>.

A ocorrência das fissuras orofaciais é variada. Sua incidência é de aproximadamente um em cada 500-2.000 nascidos vivos, variando de acordo com a localização geográfica, etnia e condição socioeconômica da população estudada<sup>3</sup>. No Brasil foi observada uma média de 1,46 casos para cada mil nascimentos em um estudo que avaliou a incidência de fendas labiopalatinas em 15.039 nascimentos em Alfenas, Minas Gerais<sup>4</sup>.

Quanto aos fatores relacionados à ocorrência das FL/PNS, há um consenso na literatura de que essas anomalias se tratam de uma condição multifatorial, com a interferência de fatores ambientais e genéticos<sup>5</sup>. Dentre os fatores ambientais de risco para o desenvolvimento dessas alterações estão o uso de medicamentos, como corticóides, o tabagismo, o etilismo e a dieta materna.

Algumas pesquisas sobre a etiopatogenia das FL/PNS buscam determinar o papel das variantes polimórficas dos genes associados às vias de sinalização celular que participam da formação do lábio e/ou palato e também em genes implicados na etiologia de síndromes que contém a FL/P em seu cenário clínico<sup>6,7</sup>. Dentre eles pode-se citar *TGF-β3*<sup>8</sup>, *MSX1*<sup>9</sup>, *IRF6*<sup>10</sup> e *FOXE1*<sup>11</sup>. A maioria destes trabalhos utiliza como metodologia estudos de associação ou ligação em genes candidatos e de varredura genômica em condições como caso-controle, trios, agregação familiar e concordância em gêmeos<sup>12,13,14,15</sup>.

Muitos estudos genéticos são replicados em outras populações, pois a heterogeneidade de fatores genéticos responsáveis por esta anomalia, a influência de aspectos ambientais na modulação dos genes relacionados às fissuras e as diferenças étnicas de cada população podem

contribuir para divergências entre estudos<sup>16</sup>. O Brasil, país de proporção continental, e com alta miscigenação da sua população sofre grande interferência destes fatores étnicos, por isso o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura sobre os fatores etiológicos relacionados à ocorrência das fendas labiais e/ou palatinas não sindrômicas, com ênfase nos aspectos genéticos. Foram analisados os principais trabalhos de larga escala genômica e os estudos de replicação no Brasil, bem como a influência da ancestralidade nos estudos genéticos.

### **3. REVISÃO DISCUTIDA DA LITERATURA**

#### **3.1 Fissura labial e/ou palatina não sindrômica**

As FL/PNS são os tipos mais comuns de anomalias craniofaciais. Essas alterações se desenvolvem em períodos distintos, já que a embriogênese do lábio e do palato não ocorrem simultaneamente. Entre a 4<sup>a</sup> e a 7<sup>a</sup> semana de gestação, os processos medial e lateral nasais fundem-se no processo maxilar formando o palato primário, a parte central do lábio superior e o nariz. Já o palato duro e o palato mole formam-se entre a 8<sup>a</sup> e a 12<sup>a</sup> semana de vida intrauterina através da fusão das placas do palato secundário. Quando ocorrem falhas nos processos maxilares e/ou palatinos, o indivíduo é acometido por fissura labial e palatina<sup>17</sup>.

As fendas orofaciais são divididas em quatro grupos e utiliza-se como base anatômica o forame incisivo. Elas são classificadas em fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais (FL), fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP), fissuras transforame incisivo ou fissuras labiopalatinas (FLP) e fissuras raras da face<sup>18</sup>. Podem ser anomalias completas ou incompletas, encontradas uni e/ou bilateralmente (Figuras 1, 2 e 3). As fissuras palatinas isoladas parecem ter origem diferente das fendas labiais e labiopalatinas<sup>19,20</sup>. Por isso, muitos estudos têm sido realizados neste grupo, separadamente, na tentativa de elucidar os mecanismos biológicos e genéticos envolvidos.

A prevalência exata das FL/PNS ainda não é bem estabelecida e varia de acordo com a etnia, gênero e nível socioeconômico<sup>2</sup>. No mundo, a prevalência das FL/PNS afeta aproximadamente um em cada 500 a 2.000 nascidos vivos. É mais frequente no gênero masculino e, entre as mulheres, há maior prevalência das fissuras palatinas isoladas<sup>3,4,21</sup>. A



maioria dos casos corresponde à fissura labiopalatina. Quanto ao lado afetado, a região esquerda é a mais acometida<sup>2,22,23</sup>.

Na população brasileira, um estudo durante um período de 20 anos, em Bauru-SP, demonstrou uma prevalência de 0,19 casos de fissuras orofaciais para cada mil nascidos vivos<sup>1</sup>. Já na pesquisa realizada em 2006, na Região Sul do estado de Minas Gerais, observou-se prevalência de 1,46 casos de FL/PNS para cada mil nativos<sup>4</sup>. Rodrigues et al. (2009)<sup>24</sup> encontraram prevalência estimada de 0,36/1.000 casos em um período de cinco anos no Brasil, a partir de dados extraídos de todas as regiões brasileiras. Quanto à etnia, a prevalência das FL/PNS é mais comum nas populações asiáticas e ameríndias e menos frequente na população de origem africana<sup>2</sup>.

Os indivíduos acometidos pelas FL/PNS e suas famílias sofrem um grande impacto na qualidade de vida e bem-estar psicossocial, já que esta alteração pode trazer repercussões na fala, respiração, alimentação e nos problemas odontológicos, como hipodontias e alterações no posicionamento dos dentes. Além disso, o tratamento exige um acompanhamento multidisciplinar, o que acarreta altos custos financeiros<sup>25,26</sup>.

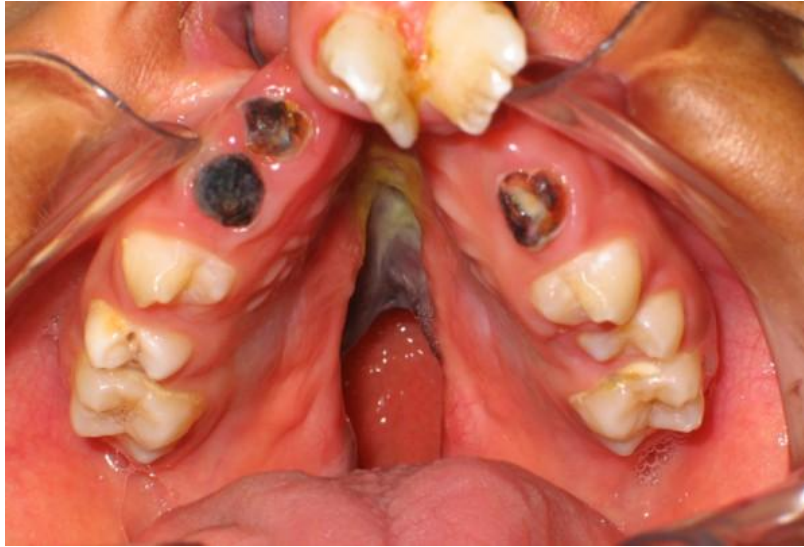
O tratamento das FL/PNS é longo e envolve múltiplos procedimentos cirúrgicos. A primeira cirurgia labial deve ser feita em torno dos seis meses, já a do palato até os 18 meses, para evitar comprometimento da fala e infecções auditivas. O tratamento ortodôntico e ortopédico é indispensável para evitar fístulas, deficiência perinasal maxilar, dentes impactados, má oclusões, devendo ser feito durante a pré dentição, dentição mista e permanente. O enxerto ósseo alveolar é outra etapa importante, que permite a estabilidade maxilar, suporte nasal e estética. Além destas etapas, o paciente deve ter acompanhamento psicológico e fonoaudiológico<sup>25</sup>.



**Figura 1. Fissura labial unilateral completa, à direita.**



**Figura 2. Fissura palatina completa.**



**Figura 3. Fissura labiopalatina bilateral.**

### 3.2 Fatores de Risco

Por ser uma doença de múltipla etiologia, diversos fatores de risco têm sido relacionados à presença de fendas orofaciais não sindrômicas (Quadro 1). Conhecer esses fatores numa determinada população é essencial, pois serve de base para aconselhamento genético e o desenvolvimento de medidas de prevenção<sup>27</sup>.

A idade avançada dos pais tem sido descrita como fator de risco para a ocorrência de fissuras e é fenotipo dependente. A idade de ambos está associada com aumento do risco para fissuras labiais com ou sem fenda palatina e apenas a idade paterna avançada representa risco para fissura palatina isolada<sup>28</sup>. Apesar destes achados Jamilian *et al.* (2007)<sup>29</sup> não encontraram esta associação.

Consanguinidade também está relacionada a etiologia das FL/PNS<sup>5</sup>. Ravichandra *et al.* (2012)<sup>30</sup> demonstraram em estudo de acompanhamento de 10 anos, que mais da metade dos indivíduos acometidos por esta anomalia tinham histórico de consanguinidade entre os pais.

Alguns estudos demonstram também que mães que utilizam medicamentos como corticóides e anticonvulsivantes têm um risco maior de gerar filhos com FL/PNS<sup>31</sup>. O risco é aumentado quando o uso é realizado no primeiro trimestre de gestação<sup>32</sup>.

Etilismo também representa um fator de risco para a ocorrência de FL/PNS<sup>5</sup>. Está diretamente relacionado ao tempo, dose e tipo de bebida consumida, sendo as destiladas as mais prejudiciais<sup>33</sup>.

<b>FATORES DE RISCO</b>	<b>AUTORES</b>
Tabagismo durante a gestação <sup>5,33</sup>	Leite e Koifman (2009); Leiby <i>et al</i> (2010)
Fumo passivo pela gestante <sup>42</sup>	Taghavi <i>et al</i> (2012)
Álcool <sup>5,33</sup>	Leite e Koifman (2009); Romitti <i>et al.</i> (2007)
Idade avançada dos pais <sup>28</sup>	Bille (2005)
Consanguinidade <sup>5,30</sup>	Leite e Koifman (2009); Ravichandra (2012)
Polimorfismos genéticos <sup>6,7,8,9,10,11,12</sup>	Scapoli <i>et al.</i> , (2008); Letra <i>et al</i> (2010); Vieira <i>et al</i> (2003); Carinci <i>et al</i> (2007); Paranaíba <i>et al</i> (2010); Moreno <i>et al</i> (2009); Mangold <i>et al.</i> , (2009)
Uso de corticóides e anticonvulsivantes <sup>31,32</sup>	Leite <i>et al.</i> (2005); Zarante <i>et al.</i> (2009)
Suplementação com ácido fólico <sup>37,38</sup>	Jonhson <i>et al</i> (2008); Taghavi <i>et al</i> (2012)
Exposição a pesticidas <sup>34</sup>	Blanca <i>et al</i> (2008)
Ocorrência prévia de aborto <sup>34</sup>	Blanca <i>et al</i> (2008)
Obesidade materna <sup>35,36</sup>	Cedergren & Källén (2005); Stott-Miller <i>et al.</i> (2010)
Hipertensão <sup>33</sup>	Leiby <i>et al</i> (2010)

**QUADRO 1. Distribuição dos fatores de risco das fissuras orofaciais não sindrômicas**

Outros fatores de risco já foram pesquisados, mas não tiveram associação confirmada, a exemplo da exposição à poluentes durante a gravidez, como o monóxido de carbono, dióxido de nitrogênio e ozônio<sup>38</sup>.

A suplementação de ácido fólico na gestação como um fator de proteção na ocorrência de anomalias decorrentes de defeitos no tubo neural já foi estabelecida, mas o impacto da suplementação vitamínica na prevenção de fendas orofaciais ainda é controverso, apesar de

o folato ser um componente essencial para o desenvolvimento do feto durante a embriogênese<sup>39,40,41,42</sup>.

Quanto à genética, muitos estudos têm demonstrado a participação de genes polimórficos na etiologia das FL/P não síndrômicas, em especial aqueles envolvidos no processo de formação do lábio e do palato. Polimorfismo de genes do reparo de DNA também tem sido citado<sup>6</sup>.

Diversos genes já foram sugeridos como candidatos para a ocorrência das fendas labiais e/ou palatinas não síndrômicas. Alguns genes ou regiões cromossômicas parecem estar mais frequentemente associadas a esses defeitos e já foram encontrados em diversas populações. Novos genes estão sendo descobertos e demonstram os complexos mecanismos envolvidos na etiologia destes defeitos<sup>12</sup>.

### 3.3 Fatores Genéticos

O papel da genética na etiologia das FL/PNS é muito relevante. A maioria dos estudos genéticos sobre as fissuras não-síndrômicas focam suas pesquisas nos subfenótipos FL e FLP, por terem maior prevalência. As fissuras palatinas exibem determinantes genéticos distintos da FL e FLP<sup>14</sup>.

As abordagens para o estudo das FL/PNS incluem análise de ligação com famílias, estudos de associação do tipo caso-controle ou com trios, identificação de alterações cromossômicas e microdeleções nos afetados<sup>14,15,27</sup>. Os estudos de ligação utilizam marcadores genéticos conhecidos e faz-se o acompanhamento de várias gerações de indivíduos. Já os estudos de associação de regiões candidatas e de varredura genômica são fundamentados na análise da frequência de polimorfismos entre casos e controles. Estabelece-se uma associação estatística entre a presença de determinada variante polimórfica e a manifestação do fenótipo<sup>43</sup>.

Os estudos atuais de ligação e de associação do genoma, que abrangem diversas populações, demonstram que inúmeros genes e *loci* gênicos, situados em diferentes regiões cromossômicas tais como 9q21 e 1p32<sup>19</sup>, 8q24.21<sup>44,45</sup>, 10q25.3 e 17q22<sup>46</sup>, e 6q14.2-14.3<sup>7</sup>, podem estar relacionados à etiologia das FL/PNS.

Muitos estudos sobre a etiologia das FL/PNS envolvem a pesquisa de polimorfismos genéticos. Polimorfismos são mutações no DNA com frequência esperada na população geral de pelo menos 1%. Existem vários tipos de polimorfismos no genoma decorrentes de substituições, deleções, inserções ou duplicações na sequência de nucleotídeos. Os polimorfismos podem ou não estar associados a uma determinada doença. O tipo mais comum de polimorfismo genético é o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP), que são formas variantes na sequência de DNA que podem estar presentes nos indivíduos de uma população dentro de um espectro considerado normal. A hipótese de que a forma variante possa estar associada à função alterada de um gene em particular e, por consequência, exercer algum papel na etiologia das FL/P pode ser analisado por meio do estudo das frequências desses polimorfismos em indivíduos afetados e não afetados<sup>47</sup>.

### 3.4 Genes Candidatos e Polimorfismos Genéticos

Os estudos genéticos demonstram que vários genes e loci gênicos que participam das vias de sinalização associadas ao desenvolvimento do lábio e do palato podem estar relacionados à etiologia das FL/P não-sindrômicas<sup>9,48</sup>. Mutações e polimorfismos em genes responsáveis por síndromes que contêm a FL/P como uma característica fenotípica também são fortes candidatos etiológicos para as FL/P não-sindrômicas<sup>6</sup>.

Dentre os genes associados às síndromes que já foram correlacionados às FL/PNS está o *IRF6*. Mutações neste gene foram relatadas em portadores da síndrome de van der Woude, caracterizada pela presença de FL/P<sup>49</sup>. Quanto às fissuras, em populações hispânicas, caucasianas e afroamericanas já foram encontradas correlações entre o polimorfismo rs2013162 do gene *IRF6* e a ocorrência de FL/PNS<sup>50</sup>. Na Noruega, o polimorfismo rs2235371 do gene *IRF6*, que resulta na substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 274 da sequência de aminoácidos (V274I) da estrutura protéica de *IRF6* foi associado às FL/PNS<sup>51</sup>. Já Mangold *et al*<sup>12</sup> não identificaram mutações relacionadas às fissuras no gene *IRF6*, na população da Europa central. O polimorfismo rs642961, do gene *IRF6* foi associado às fissuras labiais na população brasileira de cinco cidades, a saber Santarém, Fortaleza, Barbalha, Maceió e Rio de Janeiro. Entretanto em estudos com a população de fissurados do sul de Minas Gerais não foi observada associação com as FL/PNS<sup>10</sup>.

Genes que são altamente expressos durante o desenvolvimento craniofacial também foram estudados em relação ao seu papel na etiologia das FL/P não sindrômicas, incluindo o *TGF $\alpha$* <sup>52</sup>, *TGF $\beta$ 3*<sup>53</sup>, *MSXI*<sup>54,55</sup>, *FOXE1*<sup>11</sup>, *JAG2*<sup>20,56</sup>, *LHX8*, *MSX2*, *SKI* e *SPRY2*<sup>57</sup>, *PTCH*<sup>58</sup>, *PVR* e *PVRL2*<sup>59</sup>, *PVLR1*<sup>53</sup>, *FGFs*<sup>60,61</sup>, *RAR $\alpha$* <sup>9</sup> e *BCL3*<sup>62</sup>.

Genes relacionados ao metabolismo do ácido fólico também foram identificados nestes defeitos, a exemplo dos polimorfismos rs1801133 e rs2274976 do gene *MTHFR*, rs2236225, rs1950902, rs10813 e rs17857382 do gene *MTHFD1*, rs1805087 e rs2229274 do gene *MTR*, e o polimorfismo rs1051266 do gene *SLC19A1*, observados na população brasileira de indivíduos fissurados<sup>63</sup>. Entretanto, em um estudo caso controle, também na população brasileira não foi observada associação na ocorrência FLP/NS com os genes polimórficos *MTHFR*, *MTR* e *MTRR*<sup>64</sup>.

Recentes estudos de larga escala genômica, com abrangência de diversas populações da Europa e Ásia, revelaram novos polimorfismos genéticos como marcadores de suscetibilidade ao desenvolvimento de FL/PNS. Entre eles pode-se citar os polimorfismos situados nos *loci* 1p22.1 (rs560426)<sup>65</sup>, 1q32 (rs2013162)<sup>19,54,66</sup>, 8q24 (rs987525 e rs1530300)<sup>44,45,65</sup>, 9q22 (rs1443434 e rs3758249)<sup>11</sup>, 10q25.3 (rs7078160)<sup>46,67</sup>, 18q22 (rs17085106)<sup>44</sup> e 20q12 (rs13041247)<sup>68</sup>. Esses estudos têm sido replicados em diversas populações, inclusive a brasileira.

Dentre os genes identificados nessas pesquisas estão o *MAFB* e o *ABCA4*. *ABCA4* codifica uma proteína transmembranar e mutações neste gene desempenham um papel importante na etiologia da doença de Stargardt e retinopatias. *MAFB* codifica um fator de transcrição que é expresso no palato de ratos e desempenha um papel no desenvolvimento do lábio e palato. Mutações nestes genes foram associadas à ocorrência de FLP/NS em asiáticos<sup>68</sup>. Já na população brasileira houve associação apenas do polimorfismo rs560426 do gene *ABCA4* e a ocorrência de fissura labial com ou sem fissura palatina<sup>69,70</sup>.

O gene *FOXE1* também foi associado à ocorrência das FL/PNS. Segundo Moreno *et al*<sup>11</sup> este gene é expresso no epitélio envolvido na fusão entre os processos nasais medianos e maxilar. Estes autores realizaram um estudo genético nas populações da Colômbia, EUA e Filipinas e encontraram associação entre os polimorfismos rs3758249 e rs4460498 do gene *FOXE1* e a

ocorrência de todos os fenótipos de FL/PNS. Já Marazita *et al*<sup>19</sup> associaram o polimorfismo rs3758249 do gene *FOXE1* apenas com a ocorrência de fendas labiais com ou sem fissuras palatinas, sem correlação com a ocorrência das fendas palatinas isoladas. Essa associação foi encontrada em famílias de seis países: Filipinas, Colômbia, China, Índia, Turquia e EUA. Na população brasileira oriunda do sul de Minas Gerais este polimorfismo não foi associado às fendas<sup>69</sup>.

Algumas áreas cromossômicas envolvidas na ocorrência de fissuras orofaciais pertencem a regiões intergênicas, como o locus 10q25.3 encontrado em indivíduos fissurados originários da Europa central<sup>46</sup>. Na região 18q22, uma variante rara de polimorfismo, o rs17085106, foi identificado em descendentes europeus da região da Filadélfia, Estados Unidos<sup>44</sup>. Os SNPs rs7078160, do locus 10q25.3, e rs17085106, da região 18q22, foram pesquisados na população brasileira do sul de Minas Gerais e não foi observada associação com as FL/PNS<sup>69</sup>.

Uma das regiões intergênicas que tem apresentado associação positiva com as FL/PNS em diferentes populações é a 8q24. Foi demonstrado que esta região está associada ao desenvolvimento de vários tipos de cânceres. Entretanto, a região relacionada ao câncer não tem a mesma localização daquela que está associada com FL/PNS<sup>71</sup>. O SNP rs987525 foi associado às FL/PNS em indivíduos oriundos da Europa Central<sup>45</sup>, Filadélfia, Estados Unidos, Polônia<sup>44</sup> e na população brasileira de fissurados oriundos do sul de Minas Gerais<sup>69</sup> e Santarém, Fortaleza, Barbalha, Maceió e Rio de Janeiro<sup>72</sup>. Entretanto, alguns estudos de replicação em populações da Nigéria<sup>73</sup> e China<sup>74</sup> não encontraram relação deste polimorfismo com as FL/PNS. O SNP rs1530300, localizado nesta mesma região, também já foi associado às FL/PNS em populações da Europa Central<sup>45</sup>, Filadélfia, Estados Unidos<sup>44</sup> e na população brasileira do sul de Minas Gerais<sup>69</sup>.

### **3.5 Ancestralidade**

Um dos grandes desafios das pesquisas envolvendo polimorfismos genéticos é a influência da ancestralidade, pois a depender da etnia um mesmo polimorfismo pode conferir risco em uma população e proteção em outra. Isso torna-se ainda mais relevante em populações heterogêneas, como a brasileira, que é fruto da mistura de diversas etnias, como ameríndia, africana e europeia<sup>75</sup>.



No Brasil, a única fonte de informação sobre a composição étnica da população é a autodeclaração de cor da pele, realizada através do censo pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). De acordo com esse levantamento, a população do Brasil é composta de 48,2% indivíduos que se auto-declaram brancos, e no sudeste do Brasil, esse percentual é de 56,7%. No entanto, as informações geradas pela autodeclaração da cor da pele são subjetivas, principalmente porque no Brasil há um grande número de termos para identificar as variações na cor da pele e também essa classificação sofre interferência de variáveis como posição social, educação, sexo, idade e diferenças regionais e culturais<sup>76</sup>. Estes fatores fazem com que as características físicas de aparência tais como a pele, olhos, cabelo, a forma dos lábios e nariz sejam fracos indicadores da etnia de um brasileiro<sup>77</sup>.

Nos últimos anos, algumas estratégias foram criadas para a caracterização genômica da ancestralidade dos indivíduos. Foram desenvolvidos painéis informativos de ancestralidade, que são marcadores autossômicos utilizados para estimar a ascendência do genoma de uma população ou indivíduo, e mostram diferenças nas frequências dos alelos entre populações distintas<sup>78,79</sup>.

Outro método para caracterização genômica da ancestralidade é a análise do DNA mitocondrial (mtDNA), a partir da sequência de regiões hipervariáveis (HV) do genoma mitocondrial<sup>80</sup>. Entretanto, os estudos demonstram que só a sequência mitocondrial sozinha não determina a etnia, pois se refere exclusivamente à herança materna<sup>81</sup>. Isso não têm a mesma eficiência dos estudos que utilizam os painéis informativos de ancestralidade.

As pesquisas de caracterização da ancestralidade na população brasileira têm demonstrado resultados interessantes. Um estudo realizado em pelo menos uma cidade de cada região brasileira, demonstrou que independente da região do país, a contribuição europeia é a mais prevalente<sup>82</sup>. Outros estudos em indivíduos oriundo do sul de Minas Gerais, Fortaleza, Maceió, Santarém, Barbalha, Rio de Janeiro e São Paulo também demonstraram predomínio europeu<sup>69,72,80</sup>. Acredita-se que devido à imigração de seis milhões de europeus durante os séculos 19 e 20 ocorreu um fenômeno descrito como “branqueamento” do Brasil, mesmo em regiões com maior influência de outras etnias, como o nordeste e norte, que são conhecidos pela alta contribuição africana e ameríndia, respectivamente<sup>83</sup>.

Cardena *et al*<sup>80</sup> realizaram uma comparação entre a autodeclaração da cor da pele e a ancestralidade genômica. Foi demonstrado que os indivíduos que se autodeclararam brancos tiveram uma maior contribuição da ascendência europeia (63,3%), mas estes indivíduos também tiveram uma contribuição significativa de ancestralidade genômica africana (22,2%). Aqueles que se autodeclararam como pardos mostraram contribuição média semelhante europeia (45,4%) e africana (41%). Entre os que se declararam como negros a contribuição do genoma principal era africana (55,6%), mas estes indivíduos também tiveram uma proporção significativa de ancestralidade genômica europeia (32,1%). Outros estudos também demonstraram discrepâncias entre a autodeclaração da cor de pele e a ancestralidade genômica<sup>84,85</sup>.

Algumas doenças associadas à fatores genéticos sofrem influência da etnia, a exemplo das fissuras labiais e/ou palatinas não sindrômicas. Essas anomalias apresentam maior prevalência em indivíduos de ancestralidade asiática e europeia e uma frequência menor em populações africanas. A influência da etnia pode ser observada nos estudos do polimorfismo rs987525, na região cromossômica 8q24. A presença do alelo C neste polimorfismo foi significativamente correlacionada com um risco para desenvolvimento de fissuras em indivíduos de origem europeia, incluindo Alemanha, Estônia, Lituânia e Polônia e descendentes de europeus oriundos dos Estados Unidos<sup>44,45,65,67,68</sup>. Já indivíduos de ascendência asiática ou africana não demonstram risco aumentado na presença do alelo de risco C<sup>68,73,74,86</sup>. Entretanto, essas associações são baseadas nas características físicas dos indivíduos. A ancestralidade genômica não foi pesquisada nesses estudos.

Nas pesquisas mais recentes sobre as FL/PNS, a pesquisa da ancestralidade tem sido realizada, pois a associação do polimorfismo com a fissura é insuficiente no esclarecimento da etiologia desta patologia<sup>61,69,72,87</sup>. Esses trabalhos são pioneiros no mundo e começaram a ser publicados em 2012 nos estudos que envolvem a população brasileira de fissurados. Este grupo mostra níveis elevados de diversidade genômica, o que pode gerar implicações importantes na susceptibilidade às FL/PNS.

Na pesquisa sobre o polimorfismo rs987525, na região cromossômica 8q24, Brito *et al*<sup>72</sup> incluíram na metodologia a realização da ancestralidade genômica. Na população estudada, oriunda do sul de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Fortaleza, Maceió e Barbalha, o alelo A desse

polimorfismo foi o que demonstrou risco para as fissuras labiais e labiopalatinas. Além disso, os autores investigaram se a ascendência europeia influenciava esta associação, através da estratificação das amostras de fissurados em dois grupos, um europeu com 361 pacientes com mais de 50% de ascendência europeia e outro composto por não europeu com 110 pacientes com menos de 50% de ascendência europeia. Nesta análise observou-se que havia uma associação mais forte do polimorfismo rs987525 com as FL e FLP no grupo europeu do que no não europeu.

Já Bagodarkis *et al*<sup>69</sup>, não encontraram associações entre os marcadores polimórficos de susceptibilidade 1q32 (rs2013162), 9q21 (rs1443434 e rs3758249), 10q25.3 (rs7078160), 18q22 (rs17085106) e 20q12 (rs13041247) e a ocorrência de FL/PNS na população brasileira oriunda do sul de Minas Gerais. Os autores acreditam que estes polimorfismos não desempenham papel importante na etiologia das FL/PNS em grupos altamente miscigenados como o estudado, que apresentou contribuição das ancestralidades europeia, africana e ameríndia.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A etiologia das FL/PNS é multifatorial, com envolvimento de fatores ambientais e genéticos e forte interferência de fatores étnicos. Ultimamente, o estudo da ancestralidade genômica tem sido incorporado às pesquisas que associam os polimorfismos genéticos às fissuras e demonstram que apesar da miscigenação nas diferentes regiões, há um predomínio da ascendência europeia na população de indivíduos fissurados.

### **ABSTRACT**

*Cleft lip, cleft palate are craniofacial anomalies result of defects in the fusion of the craniofacial processes. These changes have an impact varied and are more common in non-syndromic. This paper aims to carry out a review of the literature about nonsyndromic cleft lip and/or palate, with emphasis on genetic aspects. We conducted a search for articles on computadorized databases such as Medline, Lilacs and Pubmed. According to the critical analysis of the selected articles, we found that several genes and chromosomal regions have been associated with orofacial clefts in genome wide association studies, such as IRF6, ABCA4, MAFB and 8q24. It was found that the etiology of clefts is multifactorial, involving genetic and environmental factors. We also observed strong interference of ethnic factors, especially in case-control studies. Some polymorphisms identified in GWAS studies were replicated and associated in Brazilian population, like rs987525, rs1530300, rs560426. The etiology of NSCL/P is multifactorial with strong interference of ethnic factors, so lately genomic ancestry studies has been incorporated into the research associating genetic polymorphisms and NSCL/P.*

*Keywords: Genetic polymorphism, cleft lip, cleft palate.*

**REFERÊNCIAS (R)**

1. Loffredo LCM, Souza JMP, Freitas FAS, Mossey PA. Oral clefts and vitamin supplementation. *Cleft Palate Craniofac J* 2001; 38(1):76-8
2. Gorlin R, Cohen M, Hennekam R. *Syndromes of the head and neck*. 4th ed. New York: Oxford University Press. 2001.
3. Genisca AE, Frías JL, Broussard CS, Honein MA, Lammer EJ, Moore CA et al. Orofacial Clefts in the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2004
4. Martelli-Júnior H, Orsi Júnior J, Chaves MR, *et al.* Estudo epidemiológico das fissuras labiais e palatais em Alfenas - Minas Gerais - de 1986 a 1998. *RPG*. 2006; 13: 31-5.
5. Leite ISCG, Koifman S. Oral clefts, consanguinity, parental tobacco and alcohol use: a case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz Oral Res*. 2009; 23: 31-7.
6. Scapoli L, Martinelli M, Arlotti M, Palmieri A, Masiero E, Pezzetti F, et al. Genes causing clefting syndromes as candidates for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: a family-based association study. *Eur J Oral Sci*. 2008; 116(6): 507-11.
7. Letra A, Menezes R, Fonseca RF, Govil M, McHenry T, Murphy MJ, *et al.* Novel cleft susceptibility genes in chromosome 6q. *J Dent Res*. 2010 Sep;89(9):927-32.
8. Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC. MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *J Dent Res*. 2003 Apr;82(4):289-92.
9. Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007 Oct;71(10):1509-19. Epub 2007 Jul 2.
10. Paranaíba LM, Bufalino A, Martelli-Júnior H, *et al.* Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis*. 2010; 16: 193-7.
11. Moreno LM, Mansilla MA, Bullard SA, Cooper ME, Busch TD, Machida J. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Human Molecular Genetics*, 2009, Vol. 18, No. 24.
12. Mangold E, Reutter H, Birnbaum S, *et al.* Genome-wide linkage scan of nonsyndromic orofacial clefting in 91 families of central European origin. *Am J Med Genet A*. 2009; 149: 2680-94.
13. Blanton SH, Burt A, Stal S, Mulliken JB, Garcia E, Hecht JT. Familybased study shows heterogeneity of a susceptibility locus on chromosome 8q24 for nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010; 88:256–259.

14. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011; 12:167-178.
15. Rahimov F, Marazita ML, Visel A, *et al.* Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet.* 2008; 40: 1341-7.
16. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 177-82.
17. Pegelow M, Peyrard-Janvid M, Zucchelli M, Fransson I, Larson O, Kere J, Larsson C, Karsten A. Familial non-syndromic cleft lip and palate: analysis of the IRF6 gene and clinical phenotypes. *Eur J Orthod.* 2008; 30(2): 169-75.
18. Spina, V. *et al.* Classificação das fissuras lábio-palatinas. Sugestão de modificação. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*, v. 27, n. 1, p. 5-6, 1972.
19. Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, *et al.* Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered.* 2009; 68: 151-70.
20. Jagomagi T, Nikopensius T, Krjutsčkov K, Tammekivi V, Viltrop T, Saag M, Metspalu A. MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 213–220.
21. Nagase Y, Natsume N, Kato T, Hayakawa T. Epidemiological Analysis of Cleft Lip and/or Palate by Cleft Pattern. *J. Maxillofac. Oral Surg.* (Sept-Dec 2010) 9(4):389–395
22. Freitas JA, Dalben GS, Santamaria M, Júnior Freitas PZ. Current data on the characterization of oral clefts in Brazil. *Braz Oral Res.* 2004; 18(2): 128-33.
23. Martelli-Junior H, Porto LV, Martelli DR, Bonan PR, Freitas AB, Della Coletta R. Prevalence of nonsyndromic oral clefts in a reference hospital in the state of Minas Gerais, Brazil, between 2000-2005. *Braz Oral Res.* 2007; 21(4): 314-7.
24. Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res.* 2009; 23(1): 38-42.
25. Guerrero CA. Cleft lip and palate surgery: 30 years follow-up. *Ann Maxillofac Surg.* 2012 Jul-Dec; 2(2): 153–157.
26. Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis.* 2009 Oct;15(7):437-53
27. Kohli SS, Kohli VS. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. *J Oral Maxillofac Pathol* 2012;16:64-72.

28. Bille C, Skytthe A, Vach W, Knudsen LB, Andersen AN, Murray JC et al. Parent's Age and the Risk of Oral Clefts. *Epidemiology*. 2005 May ; 16(3): 311–316.
29. Jamilian A, Nayeri F, Babayan A. Incidence of cleft lip and palate in Tehran. *J Indian Soc Pedod Prevent Dent*.2007;12(2):174-6.
30. Ravichandran K, Shoukri M, Aljohar A, Shazia NS, Al-Twajjri Y, Al Jarba I. Consanguinity and occurrence of cleft lip/palate: a hospital-based registry study in Riyadh. *Am J Med Genet A*. 2012 Mar;158A(3):541-6.
31. Leite IC, Paumgartten FJR, Koifman S. Fendas orofaciais no recém-nascido e o uso de medicamentos e condições de saúde materna: estudo caso controle na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Ver Bras Saúde Matern Infant*. Recife 2005; 5 (1): 35-43.
32. Zarante I, Lopez MA, Caro A, Garcia-Reyes JC, Ospina JC. Impact and risk factor of craniofacial malformations in a colombian population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2009; 19.
33. Lebbby KD, Tan F, and Brown C.P. Maternal Factors and Disparities Associated with Oral Clefts. *Ethn Dis*. 2010 ; 20(1 Suppl 1): S1–146-9.
34. Blanca SG, Lopez ML, Rico MA, Garduno F. Oral clefts: a retrospective study of prevalence and predisposal factors in the state of Mexico. *Journal of Oral Science*, Vol.50, n 2, 123-129, 2008.
35. Cedergren M, Källén B. Maternal obesity and the risk for orofacial clefts in the offspring. *Cleft Palate Craniofac J*. 2005 Jul;42(4):367-71.
36. Stott-Miller M, Heike CL, Kratz M, Starr JR. Increased risk of orofacial clefts associated with maternal obesity: case-control study and Monte Carlo-based bias analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2010 Sep;24(5):502-12.
37. Romitti PA, Sun L, Honein MA, Reefhuis J, Correa A, Rasmussen SA. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk of orofacial clefts. *Am J Epidemiol*. 2007; 166(7): 775-85.
38. Marshall EG, Harris G, Wartenberg D. OralCleft Defects and Maternal Exposure to Ambient Air Pollutants in New Jersey. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010 April ; 88(4): 205–215.
39. Badovinac RL, Werler MM, Williams PL, et al. Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2007; 79: 8-15.
40. Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K, et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ* 2007; 334: 464.
41. Johnson CY and Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *International Journal of Epidemiology* 2008;37:1041–1058.

42. Taghavi N, Mollaian M, Alizadeh P, Moshref M, Modabernia S, Akbarzade AR. Orofacial Clefts and Risk Factors in Tehran, Iran: A Case Control Study. *Iran Red Crescent Med J* 2012; 14(1):25-30
43. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science*. 2008 Nov 7;322 (5903):881-8.
44. Grant SF, Wang K, Zhang H, *et al.* Genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr*. 2009; 155: 909-13.
45. Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, *et al.* Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet*. 2009; 41: 473-7.
46. Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, *et al.* Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet*. 2010. 42: 24-6.
47. Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcolm S. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet*. 2000; 106(3):345-350.
48. Marazita ML, Mooney MP. Current concepts in the embryology and genetics of cleft lip and palate. *Clin Plastic Surg*. 2004; 31: 125-40.
49. Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS *et al.* Mutation in IRF6 cause van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet*. 2002; 32: 285-289.
50. Blanton SH, Cortez A, Stal S, Mulliken JB, Finnell RH, Hecht JT. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A* 2005;137:259–262.
51. Jugessur A, Rahimov F, Lie RT, *et al.* Genetic variants in IRF6 and the risk of facial clefts: single-marker and haplotype-based analyses in a population-based case-control study of facial clefts in Norway. *Genet Epidemiol*. 2008; 32: 413-24.
52. Sull JW, Liang K, Hetmanski JB. *et al.* Evidence that TGFA influences risk to cleft lip with/without cleft palate through unconventional genetic mechanisms *Hum Genet*. 2009 September ; 126(3): 385–394.
53. Saleem S, Rajendran R, Moinak B, Anna J, Pramod BJ. Evidence for transforming growth factor-beta 3 gene polymorphism in non-syndromic cleft lip and palate patients from Indian sub-continent. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Mar 1;17(2):e197-200.



54. Park J, Park BY, Kim H, Lee JE, Suh I, Nam CM et al. MSXI polymorphism associated with risk of oral cleft in Korea: Evidence from case-parent trio and case-control studies. *Yonsei Medical Journal*. 2007;48:101-108.
55. Ingersoll RG, Hetmanski J, Park J, Fallin MD, McIntosh I, Wu-Chou Y et al. Association between genes on chromosome 4p16 and non-syndromic oral clefts in four populations. *European Journal of Human Genetics*. 2010; 18: 726–732.
56. Paranaíba LM, Aquino SN, Bufalino A, Martelli-Júnior H, Graner E, Brito LA, e Passos Bueno MR, Coletta RD, Swerts MS. Contribution of polymorphisms in genes associated with craniofacial development to the risk of nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013; May 1;18(3):e414-20.
57. Avila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K, et al. PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *Am J Med Genet*. 2006; 140; 23 /;2562-70.
58. Mansilla MA, Cooper ME, Goldstein T, Castilla EE, Lopez Camelo JS, Marazita ML, Murray JC. Contributions of PTCH gene variants to isolated cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2006 Jan;43(1):21-9.
59. Warrington A, Vieira AR, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Romitti PA, et al. Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. *J med Genet*. 2006; 43:26.
60. Riley BM, Murray JC. Sequence evaluation of FGF and FGFR gene conserved non-coding elements in non-syndromic cleft lip and palate cases. *Am J Med Genet A*. 2007 Dec 15;143A(24):3228-34.
61. Aquino SN, Messetti AC, Bagordakis E, Martelli-Júnior H, Swerts MSO, Graner E, et al. Polymorphisms in FGF12, VCL, CX43 and VAX1 in Brazilian patients with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *BMC Medical Genetics* 2013, 14:53.
62. Gaspar DA, Matioli SR, Pavanello RC, et al. Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *European Journal of Human Genetics*, 2004, 12: 521–526.
63. Bufalino A, Ribeiro Paranaíba LM, Nascimento de Aquino S, et al. Maternal polymorphisms in folic acid metabolic genes are associated with nonsyndromic cleft lip and/or palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010; 88: 980-6.

64. Brandalize AP, Bandinelli E, Borba JB, *et al.* Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40: 787-791.
65. Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Biedziak B, Paradowska P, Jagodzinski PP. Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010 Jul; 88(7):538-45.
66. Wang Y, Li X, Zhu WL, Guo JZ, Song XM, Li SQ, Li Y. Genome-wide and interaction linkage scan for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in two multiplex families in Shenyang, China. *Biomed Environ Sci.* 2010; Oct; 23(5):363-70.
67. Nikopensius T, Ambrozaityte L, Ludwig KU, *et al.* Replication of novel susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24 in Estonian and Lithuanian patients. *Am J Med Genet.* 2009; 149A:2551–2553
68. Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, *et al.* A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet.* 2010; 42: 525-9.
69. Bagordakis E, Paranaiba LM, Brito LA, Aquino SA, Massetti AC, Martelli-Junior H *et al.* Polymorphisms at Regions 1p22.1 (rs560426) and 8q24 (rs1530300) Are Risk Markers for Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate in the Brazilian Population. *Am J Med Genet.* 2013; Part A 9999:1–4.
70. Fontoura C, Silva RM, Granjeiro JM, Letra A. Further evidence of association of the ABCA4 gene with cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci* 2012; 120: 553–557.
71. Ghousaini M, Song H, Koessler T, Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Driver KE *et al.* Multiple loci with different cancer specificities within the 8q24 gene desert. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Jul 2;100(13):962-6
72. Brito LA, Paranaiba LM, Bassi CF, Masotti C, Malcher C, Schlesinger D, Rocha KM *et al.* *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012 Jun;94(6):464-8.
73. Butali A, Mossey PA, Adeyemo WL, Jezewski PA, Onwuamah CK, Ogunlewe MO, *et al.* Genetic studies in the nigerian population implicate an MSX1 mutation in complex oral facial clefting disorders. *Cleft Palate Craniofac J.* 2011 Nov; 48(6):646-53.
74. Xu MY, Deng XL, Tata LJ, Han H, Chen XH, Liu TY, Chen QS, Yao XW, Tang SJ. Case-Control and Family-Based Association Studies of Novel Susceptibility Locus 8q24 in Nonsyndromic Cleft Lip with or Without Cleft Palate in a Southern Han Chinese Population Located in Guangdong Province. *DNA Cell Biol.* 2011; Nov 1
75. Salzano FM, Bortolini MC. *The Evolution and Genetics of Latin American Populations.* Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2002.

76. Telles EE. Racial ambiguity among the Brazilian population. *Ethn Racial Stud.* 2002; 25: 415–441.
77. Pena SDJ. Razões para banir o conceito de etnia da medicina brasileira. *História, Ciência, Saúde.* 2005;12: 321–346.
78. Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet.* 2006 Sep; 70(Pt):658-65.
79. Santos, N. P.; Ribeiro-Rodrigues, E. M.; Ribeiro-Dos-Santos, A. K. C.; Pereira, R.; Gusmão, L.; Amorim, A. *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat.* 2010; 31:184-90.
80. Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. 2013; *Apr 24*;8(4):e62005.
81. Lee C, Mandoiu II, Nelson CE. Inferring ethnicity from mitochondrial DNA sequence. *BMC Proc.* 2011; 5: S11.
82. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011 Feb 16;6(2):e17063
83. Leite FP, Callegari-Jacques SM, Carvalho BA, Kommers T, Matte CH, Raimann PE et al. Y-STR analysis in Brazilian and South Amerindian populations. *Am J Hum Biol.* 2008; 20:359–63.
84. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Gentil P, Moreno-Lima R, *et al.* Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *J Epidemiol.* 2011; 21: 240–245.
85. Leite TK, Fonseca RM, de França NM, Parra EJ, Pereira RW. Genomic ancestry, self-reported “color” and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. 2011; 6: e27162.
86. Weatherley-White RC, Ben ST, Jin Y, Riccardi S, Arnold TD, Spritz RA. Analysis of genomewide association signals for nonsyndromic cleft lip/palate in a Kenya African cohort. *Am J Med Genet Part A.* 2011; 155A:2422-2425.
87. Filézio MR, Bagordakis E, de Aquino SN, Pereira Messetti AC, Martelli-Júnior H, Swerts MS, Graner E, Coletta RD, Paranaíba LM. Polymorphisms in GABRB3 and oral clefting in the Brazilian population. *DNA Cell Biol.* 2013 Mar;32(3):125-9..

**MANUSCRITO II**

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA REGIÃO 8q24 (rs987525 e rs1530300) E NO  
GENE *ABCA4* (rs560426) EM PORTADORES DE FISSURAS LABIAIS E  
LABIOPALATINAS NÃO- SINDRÔMICAS**

## RESUMO

Polimorfismos de nucleotídeo único rs987525 e rs1530300, ambos localizados na região 8q24 e o polimorfismo rs560426, pertencente ao gene *ABCA4* têm sido considerados marcadores de risco para fissura labial e/ou palatina não sindrômica (FL/PNS) em várias populações. A realização de mapeamentos genéticos em populações miscigenadas, a exemplo da brasileira, tem sido pouco documentada em relação ao polimorfismo rs560426. O objetivo deste trabalho foi identificar em indivíduos fissurados nascidos e residentes no estado da Bahia (n=179) a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos rs987525, rs1530300, rs560426 e compará-la à indivíduos normais (n=221). Os polimorfismos foram genotipados pelo método de discriminação alélica com sondas fluorescentes. Não foi observada associação para os polimorfismos rs1530300 e rs560426 na ocorrência de FL/PNS. Em relação ao polimorfismo rs987525, da região 8q24, a presença do alelo A mostrou risco 1,41 vezes maior na ocorrência de FL/PNS comparadas ao alelo C (IC 95% 1,06-1,87; p= 0,02). Para o genótipo AA o risco foi de 1,58 (IC 95% 1,05-2,39; p= 0,04). Em relação às fissuras labiopalatinas (FLP) o risco do alelo A foi 1,51 vezes, quando comparado ao alelo C (IC 95% 1,10-2,08; p= 0,011). Para o genótipo AA o risco foi de 2,17 (IC 95% 1,15-4,10; p=0,021). Concluímos que o alelo A do polimorfismo rs987525 está associado ao desenvolvimento de FLP.

Palavras-chave: Fenda labial, etiologia, polimorfismo genético.

## 5. INTRODUÇÃO

As fendas labiais, labiopalatinas e palatinas não sindrômicas compreendem distúrbios de desenvolvimento, que ocorrem durante o período de formação do lábio e do palato. Estas alterações apresentam prevalência mundial que varia de 1/500 a 1/2000 nativos e dependem de fatores étnicos e nível socioeconômico. Têm efeitos sobre a fala, audição, aparência e cognição, trazendo consequências tanto para a saúde quanto para a integração social do indivíduo<sup>1,2</sup>.

As FL/PNS têm uma etiologia multifatorial, com envolvimento de fatores genéticos e ambientais<sup>2</sup>. Em relação aos aspectos genéticos, várias pesquisas têm sido desenvolvidas, demonstrando polimorfismos em genes candidatos ou regiões cromossômicas de susceptibilidade<sup>3</sup>, a exemplo do gene *ABCA4* e da região 8q24<sup>4,5,6,7</sup>. Os polimorfismos rs987525 e rs1530300 da região cromossômica 8q24 e rs560426 do gene *ABCA4* já foram associados às FL/PNS em populações homogêneas como as europeias e asiáticas. No Brasil, país de intensa miscigenação, o polimorfismo de nucleotídeo único rs560426 foi confirmado nas populações do sul do estado de Minas Gerais e São Paulo, o rs987525 e o rs1530300 nas populações do Rio de Janeiro, Fortaleza, Maceió, Santarém, Barbalha e sul de Minas Gerais<sup>8,9</sup>.

A associação de polimorfismos no gene *ABCA4* e na região intergênica 8q24 na ocorrência de FL/PNS é relativamente recente. Birbaum *et al.* (2009)<sup>6</sup> relacionaram os SNPs rs987525 e rs1530300 em fissurados na população germânica, enquanto Beaty *et al.* (2010)<sup>10</sup> descreveram o polimorfismo rs560426 nas populações com ancestralidades europeia e asiática.

Ainda não existem estudos que associem os polimorfismos rs987525, rs1530300 e rs560426 na ocorrência de fendas na população do estado da Bahia, que apresenta forte influência africana. Esta pesquisa visa validar por meio de um estudo caso-controle se tais polimorfismos descritos em outros estados brasileiros reproduzem-se na população da Bahia, considerando-se a ancestralidade europeia, africana ou indígena de cada indivíduo.

## **6. METODOLOGIA**

### **6.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa**

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos, deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Irmã Dulce com número do protocolo do CEP 69/11, cópia em anexo.

### **6.2. População**

O grupo controle foi constituído por 221 indivíduos clinicamente normais e o grupo de fissurados, composto por 179 pacientes com FL/PNS. A coleta das amostras de saliva do grupo controle foi realizada na Clínica de Graduação do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e do grupo de indivíduos fissurados no Centro de Fissuras Craniofaciais do Hospital Santo Antonio/Obras Sociais Irmã Dulce (OSID) e no Serviço de Fissurados do Hospital Pediátrico Martagão Gesteira, ambos localizados em Salvador, Bahia. As amostras foram obtidas durante tratamento odontológico. Foram excluídos indivíduos portadores de alterações congênitas associadas às FL/PNS e portadores de fissuras palatinas, já que estudos sugerem mecanismos embriológicos distintos para esta anomalia<sup>3,11</sup>.

### **6.3. Coleta das Amostras para Análise dos Polimorfismos**

Previamente à coleta, todos os voluntários ou seus responsáveis foram informados do propósito do estudo e solicitados à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido de participação. As amostras de células bucais foram coletadas por meio de um bochecho, por 60 s, de 5 ml de solução de sacarose a 3%. O conteúdo resultante do bochecho foi transferido para um tubo de 15 ml, o qual continha o volume de 5 ml de uma solução 66% alcoólica contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaCl e 7 mM EDTA.

#### 6.4. Isolamento do DNA

No laboratório, a cada tubo foi adicionada água Milli-Q autoclavada q.s.p. 15 ml. Após centrifugação (1.000 xg por 10 min) e descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em solução de lavagem, sem álcool, contendo 17 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl e 7 mM EDTA, vortexado e centrifugado a 1.000 xg por 5 min. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em solução de lise contendo 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS), 5 mM EDTA. Assim, o tubo foi levado ao banho de água durante uma hora para, em seguida, serem adicionados 10 µl de proteinase K e incubado a 50°C em movimento contínuo semicircular. Após 16 horas de incubação, foram adicionados 500 µl de uma solução aquosa de 1 mM EDTA e 7,5 M acetato de amônio. A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 12.000 xg a 4°C. O precipitado de DNA foi lavado com 70% etanol (12.000 xg por 5 min), seco e ressuspenso em tampão Tris-EDTA. A concentração e a pureza da amostra foram determinadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm.

#### 6.5. Seleção dos Polimorfismos

O SNP rs560426 localizado na região cromossômica 1p22.1 do gene *ABCA4* e os polimorfismos rs987525 e rs1530300, situados na região intergênica 8q24, foram selecionados por terem sido fortemente correlacionados às FL/PNS em estudos prévios e por apresentarem distribuição diferencial dos alelos em populações distintas<sup>5,6,8,9,10</sup>. As características dos polimorfismos genéticos deste estudo estão descritas na Tabela 1 e incluem a frequência de cada alelo ancestral em três populações de etnias diferentes, conforme o banco genético (HapMap).

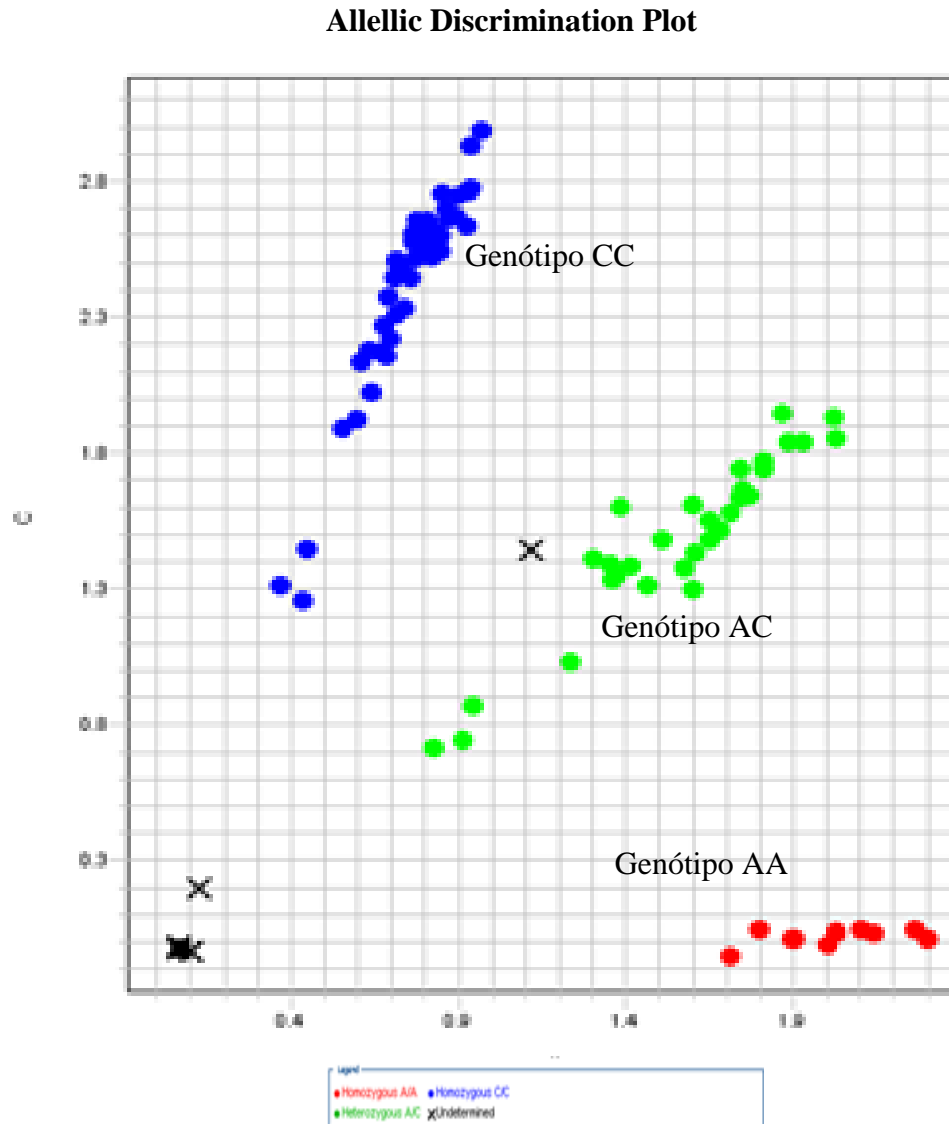


**Tabela 1. Descrição dos polimorfismos genéticos utilizados no estudo.**

Polimorfismo	Cromossomo	Gene	Alelos	Frequência Alélica (Ancestral)
rs987525	8q24.21	Desconhecido	Ancestral: A Variante: C	Européia: 21,7% Asiática: 4,4% Africana (Sub-Saara): 61,7%
rs1530300	8q24.21	Desconhecido	Ancestral: T Variante: C	Européia: 69,2% Asiática: 98,8% Africana (Sub-Saara): 88,3% Afro-americana: 100%
rs560426	1p22.1	ABCA4	Ancestral: A Variante: G	Européia: 52,5% Asiática: 78,4% Africana (Sub-Saara): 55,1%

## 6.6. Genotipagem

Foi utilizado o método de discriminação alélica com sondas fluorescentes no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems). A análise foi realizada em uma reação de 8 µl contendo 4 µl de 2x Genotyping Master Mix, 0,2 µl da mistura de primers e sondas e 2 ng DNA, os quais foram diluídos em 3,8 µl de água livre de DNase e RNase. Os parâmetros de amplificação foram: 1 ciclo de 30 s a 60°C e 10 min a 95°C (desnaturação inicial) e 40 ciclos de 15 s a 92°C e 1 min a 60°C (estágio de amplificação), os quais foram seguidos por 1 ciclo de 30 s a 60°C. Para validação dos resultados, a reação para cada polimorfismo foi repetida em 10% das amostras que foram aleatoriamente escolhidas (Figura 4).



**Figura 4.** Genotipagem do polimorfismo rs987525 na região cromossômica 8q24 em pacientes com FL/PNS, por meio do sistema de discriminação alélica com sondas fluorescentes. A reação de PCR em tempo real foi realizada com a presença de um par de primers específico e 2 sondas ligadas à *fluorocromos* para discriminação alélica. Neste caso, a sonda que reconhece o nucleotídeo ancestral A foi marcada com VIC, enquanto que a sonda que reconhece o nucleotídeo variante C foi ligada a FAM. O resultado da discriminação alélica revela amostras homozigotas para VIC (AA), heterozigotas (AC) e homozigotas para FAM (CC).

### 6.7. Ancestralidade

Os 40 polimorfismos de inserção e deleção informativos de ancestralidade descritos por Bastos-Rodrigues *et al.* (2009)<sup>12</sup> foram utilizados neste estudo. As reações de PCR multiplex foram realizadas com 5 a 7 pares de primers por reação, escolhidos com base no tamanho dos

alelos. A cada “primer forward” foi adicionada uma cauda de M13 (Schuelke, 2000) e um “primer forward” complementar a M13 ligado ao fluoróforo FAM foi também utilizado. A reação, de volume final de 10 µl, consistiu de 1 µl 10X PCR Buffer, 0,8 µl dNTPs (2,5 mM), 0,2 µl Taq polimerase (5 U/ml), 4,95 µl H<sub>2</sub>O Milli-Q, 2 µl DNA (50 ng) e 0,75 µl da mistura de primers. A mistura de primers continha 33 µM da mistura de primers forward específicos (partes iguais de cada um), 100 µM do primer forward complementar a M13 ligado ao fluoróforo FAM e 100 µM da mistura de primers reverse (partes iguais). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 45 s e 72°C 45 s, 9 ciclos de 94°C por 30 s, 53°C por 45 s e 72°C 45 s, seguido por final extensão a 72°C por 30 min. Após as reações de amplificação, os produtos foram diluídos para subsequente análise no sequenciador automático ABI3500 DNA Analyser (Applied Biosystems). A reação consistia em 8,925 µl de Formamida HI-DI, 0,075 µl do marcador de peso molecular GS600 e 2 µl do produto da PCR diluído 10 vezes. A análise dos fragmentos foi realizada com o programa GeneMapper Software Version 4.0.

## 6.8. Análise estatística

A existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada no grupo controle e as diferenças na frequência dos alelos e genótipos em um modo de herança não restrito foram comparadas pelo teste de qui-quadrado<sup>13</sup>. O cálculo do risco de recorrência (*odds ratio*, OR) com intervalo de confiança (IC), em 95%, foi realizado para estimar o risco de cada fator na ocorrência da FL/PNS (Prism 6 for Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

Para a análise da correção de ancestralidade, os programas Structure e STRAT foram utilizados. O primeiro investiga a presença de estrutura populacional e infere, por análise bayesiana, a presença de componentes de diferentes populações ancestrais nos indivíduos. Neste estudo, foi considerada uma população com três origens (K=3), europeia, africana e ameríndia. O programa STRAT utiliza os dados gerados pelo Structure referentes às contribuições das populações ancestrais para cada indivíduo para aplicar correção estatística ao teste de associação entre casos e controles<sup>14</sup>. Foi utilizado  $p < 0,05$  como indicativo de diferença estatisticamente significativa.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Características Gerais dos Grupos

Foram selecionados e incluídos no grupo de pacientes fissurados 179 indivíduos. Destes 87 (48,6%) pertenciam ao sexo feminino e 92 (51,4%) ao sexo masculino. Quanto ao tipo de fissura, 48 (26,8%) possuíam FL isolada e 131 (73,2%) FLP. O grupo controle foi composto por 221 indivíduos normais, sendo 147 (66,5%) do gênero feminino e 74 (33,5%) do gênero masculino. As diferenças de gênero entre os grupos foram estatisticamente significante ( $p=0,008$ ; tabela 2).

**Tabela 2. Distribuição dos grupos controle e de fissurados em relação ao gênero.**

Gênero	Grupo caso (n=179)	Grupo controle (n=221)	p valor
Masculino	92 (51,4%)	74 (33,5%)	p= 0,0008
Feminino	87 (48,6%)	147 (66,5%)	

### 7.2. Avaliação da ancestralidade

A distribuição da ancestralidade nos grupos controle e de indivíduos portadores de FL/PNS encontra-se na tabela 3. Observou-se predomínio da ascendência europeia independente do tipo de fissura (controle = 84,6; FL = 76,4%; FLP=76,4%). As diferenças da ancestralidade entre os grupos não foram estatisticamente significantes ( $p=0,06$ ).

**Tabela 3: Distribuição da ancestralidade nos grupos controle e de indivíduos portadores de fissuras labiais e labiopalatinas não sindrômicas.**

Ancestralidade	Grupo controle	Grupo FL/PNS	Grupo FL	Grupo FLP	p valor
Ameríndia	1,4%	1,6%	1,4%	1,9%	0,06
Africana	14%	22,2%	22,2%	22,1%	
Europeia	84,6%	76,4%	76,4%	76,4%	

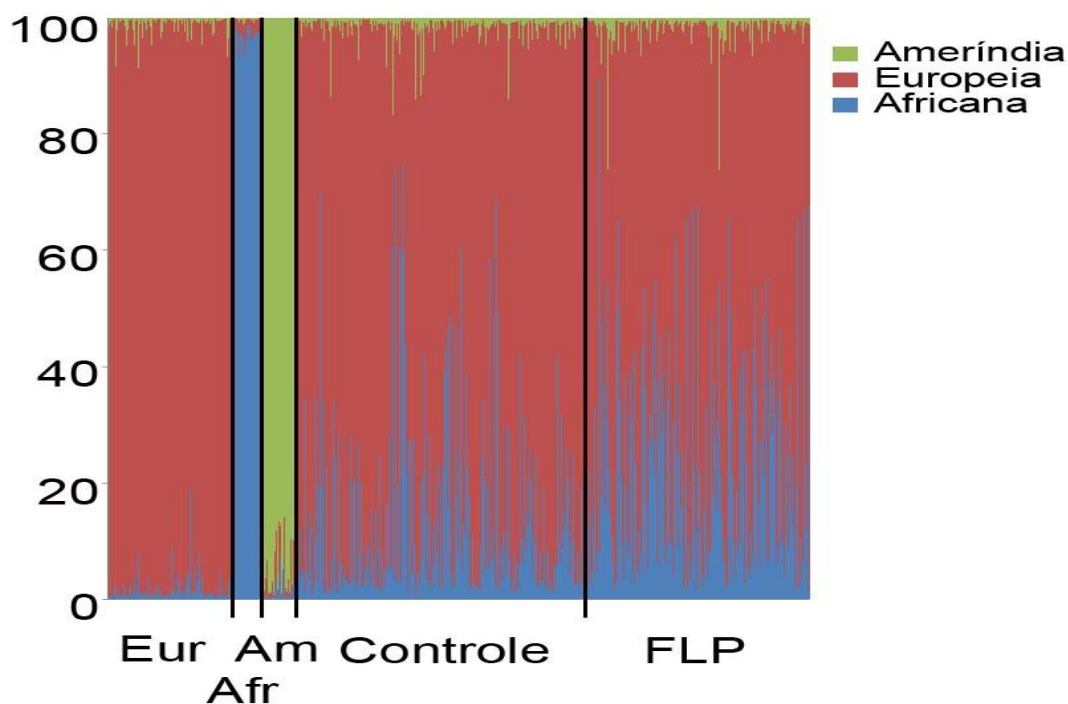


Figura 4. Representação da ancestralidade dos indivíduos dos grupos controle e FL/PNS. Cada coluna representa um indivíduo e os cálculos pelo Programa Structure foram baseados em 3 populações (K=3). A porção em vermelho corresponde à ancestralidade europeia, em azul a ancestralidade africana e em verde a ancestralidade ameríndia.

### 7.3. Frequência Alélica e Genotípica dos Polimorfismos

As frequências genotípicas para os polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4).

Tabela 4. Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Polimorfismo	HWE (p valor)
rs560426	0,60
rs987525	0,34
rs1530300	0,65

Na tabela 5 observa-se a distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 entre o grupo controle e o grupo de fissuras labiais e fissuras labiopalatinas (FL/PNS).

Para o polimorfismo rs560426, menor frequência foi observada no grupo controle para o alelo A e o genótipo AA (47,1%; n=208 e 21,3%; n=47, respectivamente). No grupo de indivíduos portadores de FL/PNS o alelo G e o genótipo GG foram os menos observados (48,3%; n=173 e 21,8%; n=39, respectivamente). Não foi identificada associação entre os genótipos e a presença de fissuras (Tabela 5).

Para o polimorfismo rs987525, o alelo A, considerado de risco, evidenciou associação com as FL/PNS ( $p=0,02$ ; OR:1,41, IC 95%:1,06-1,87). Com relação ao genótipo, observou-se que CC e CA obtiveram distribuição similar e foram os mais frequentes do grupo controle (CC e CA:42,9%; n=94). Nos fissurados o genótipo CA foi identificado em 48% dos indivíduos (n=85). Observou-se associação entre os genótipos AA e CA+AA e a presença de fissuras labiais e fissuras labiopalatinas ( $p=0,04$ ), tabela 5.

Para o polimorfismo rs1530300 o alelo C foi o menos frequente em ambos os grupos (26,9%; n=117 no grupo controle e 34,1%; n=95 nos fissurados). Em relação ao genótipo, o CC foi o menos observado nos fissurados e no grupo controle (7,8%; n=17 no grupo controle e 6,7%; n=12 nos fissurados). Não foi identificada associação entre os genótipos e a presença de fissuras (Tabela 5).

**Tabela 5. Distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 entre o grupo controle e os grupos de fissuras labiais e fissuras lábiopalatinas (FL/PNS).**

Polimorfismo	Grupo Controle n (%)	Grupo FL/PNS n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
rs560426				
Alelo				
G	234 (52,9)	173 (48,3)	Referência	
A	208 (47,1)	185 (51,7)	1,20 (0,91-1,59)	0,20
Genótipo				
GG	60 (27,1)	39 (21,8)	Referência	
GA	114 (51,6)	95 (53,1)	1,28 (0,78-2,09)	0,32
AA	47 (21,3)	45 (25,1)	1,47 (0,83-2,61)	0,19
GA+AA	161 (72,9)	140 (78,2)	1,34 (0,84-2,12)	0,24
rs987525				
Alelo				
C	282 (64,4)	199 (56,2)	Referência	
A	156 (35,6)	155 (43,8)	1,41 (1,06-1,87)	0,02
Genótipo				
CC	94 (42,9)	57 (32,2)	Referência	
CA	94 (42,9)	85 (48,0)	1,49 (0,96-2,32)	0,09
AA	31 (14,2)	35 (19,8)	1,86 (1,04-3,34)	0,04*
CA+AA	125 (57,1)	120 (67,8)	1,58 (1,05-2,39)	0,04*
rs1530300				
Alelo				
T	319 (73,1)	263 (65,9)	Referência	
C	117 (26,9)	95 (34,1)	0,98 (0,72-1,35)	0,93
Genótipo				
TT	118 (54,1)	96 (53,6)	Referência	
TC	83 (38,1)	71 (39,7)	1,05 (0,69-1,60)	0,83
CC	17 (7,8)	12 (6,7)	0,86 (0,39-1,91)	0,84
TC+CC	100 (45,9)	83 (46,4)	1,02 (0,68-1,51)	0,98

\*  $p < 0,05$ : estatisticamente significativa.

Na tabela 6 observa-se a distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 entre o grupo controle e o grupo de indivíduos portadores de fissura labial (FL).

Para o polimorfismo rs560426, o alelo A foi menos frequente no grupo controle (47,1%; n=208) e no grupo de indivíduos com fissura labial (47,9%; n=46). Em relação ao genótipo, o AA foi o menos encontrado em ambos os grupos (21,3%; n=47, no grupo controle e 22,9%; n=11, no grupo com fissura labial). Não foi observada associação entre os genótipos e a presença de fissuras labiais (Tabela 6).

Para o polimorfismo rs987525, o alelo A foi encontrado com menor frequência em ambos os grupos (35,6%; n=156, no grupo controle e 39,6%; n=38, no grupo com FL). O genótipo AA foi o menos observado tanto no grupo controle, quanto no grupo de portadores de FL (14,2%; n=31, no grupo controle e 12,5%; n=6, no grupo de indivíduos portadores de fissura labial), tabela 6.

No polimorfismo rs1530300, o alelo C foi menos frequente no grupo controle (26,9%; n=117) e no grupo de indivíduos com FL (23,4%; n=22). O genótipo CC foi o menos observado no grupo controle (7,8%; n=17). No grupo de indivíduos portadores de FL este genótipo estava ausente. Não foi verificada associação entre os genótipos deste polimorfismo e a presença de fissuras labiais (Tabela 6).

**Tabela 6. Distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 entre o grupo controle e o grupo de indivíduos portadores de fissura labial (FL).**

Polimorfismo	Grupo Controle n (%)	Grupo FL n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
<b>rs560426</b>				
Alelo				
G	234 (52,9)	50 (52,1)	Referência	
A	208 (47,1)	46 (47,9)	1,03 (0,66-1,61)	0,91
Genótipo				
GG	60 (27,1)	13 (27,1)	Referência	
GA	114 (51,6)	24 (50,0)	0,97 (0,46-2,04)	0,98
AA	47 (21,3)	11 (22,9)	1,08 (0,44-2,63)	0,98
GA+AA	161 (72,9)	35 (72,9)	1,00 (0,49-2,02)	0,97
<b>rs987525</b>				
Alelo				
C	282 (64,4)	58 (60,4)	Referência	
A	156 (35,6)	38 (39,6)	1,18 (0,75-1,86)	0,48
Genótipo				
CC	94 (42,9)	16 (33,3)	Referência	
CA	94 (42,9)	26 (54,2)	1,62 (0,82-3,22)	0,17
AA	31 (14,2)	6 (12,5)	1,14 (0,41-3,16)	0,79
CA+AA	125 (57,1)	32 (66,7)	1,50 (0,78-2,90)	0,26
<b>rs1530300</b>				
Alelo				
T	319 (73,1)	72 (76,6)	Referência	
C	117 (26,9)	22 (23,4)	0,83 (0,49-1,40)	0,52
Genótipo				
TT	118 (54,1)	25 (53,2)	Referência	
TC	83 (38,1)	22 (46,8)	1,25 (0,66-2,37)	0,51
CC	17 (7,8)	0	NA	NA
TC+CC	100 (45,9)	22 (46,8)	1,04 (0,55-1,95)	0,98



Na tabela 7 observa-se a distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 entre o grupo controle e o grupo de indivíduos portadores de fissuras labiopalatinas (FLP).

Para o polimorfismo rs560426, menor frequência foi observada no grupo controle para o alelo A e genótipo AA (47,1%; n=208 e 21,3%; n=47, respectivamente). No grupo de portadores de fissuras labiopalatinas o alelo G e o genótipo GG foram os menos observados (47,2%; n=119 e 20,6%; n=26, respectivamente). Não foi verificada associação entre os genótipos e a presença de fissuras labiopalatinas (Tabela 7).

Em relação ao polimorfismo rs987525 notou-se que o alelo A obteve menor frequência em ambos os grupos (35,6%; n=156 no grupo controle e 45,6%; n=113 no grupo com FLP) e houve associação significativa com as fissuras labiopalatinas ( $p=0,011$ ; OR: 1,51, 95% IC: 1,10-2,08). Para este polimorfismo observou-se associação do genótipo AA e CA+AA e a presença de FLP ( $p=0,021$ ; OR: 2,17, 95% IC: 1,15-4,10 para o genótipo AA e  $p=0,038$ ; OR: 1,64, 95% IC: 1,03-2,61 para os genótipos CA + AA).

No polimorfismo rs1530300, o alelo C foi menos observado no grupo controle (26,9; n=117) e no grupo com FLP (28,4%; n=72). O genótipo CC também foi o menos frequente em ambos os grupos (7,8%; n=17, no grupo controle e 9,4%; n=12 no grupo com FLP). Não foi identificada associação entre os genótipos e a presença de fissuras labiopalatinas (Tabela 7).

**Tabela 7. Distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 entre o grupo controle e o grupo de indivíduos portadores de fissuras labiopalatinas (FLP).**

Polimorfismo	Grupo Controle n (%)	Grupo FLP n (%)	OR (95% IC)	Valor de p
rs560426				
Alelo				
G	234 (52,9)	119 (47,2)	Referência	
A	208 (47,1)	133 (52,8)	1,26 (0,92-1,71)	0,16
Genótipo				
GG	60 (27,1)	26 (20,6)	Referência	
GA	114 (51,6)	67 (53,2)	1,35 (0,78-2,35)	0,33
AA	47 (21,3)	33 (26,2)	1,62 (0,85-3,07)	0,15
GA+AA	161 (72,9)	100 (79,4)	1,43 (0,85-2,42)	0,19
rs987525				
Alelo				
C	282 (64,4)	135 (54,4)	Referência	
A	156 (35,6)	113 (45,6)	1,51 (1,10-2,08)	0,011*
Genótipo				
CC	94 (42,9)	39 (31,5)	Referência	
CA	94 (42,9)	57 (46)	1,46 (0,88-2,40)	0,16
AA	31 (14,2)	28 (22,5)	2,17 (1,15-4,10)	0,021*
CA+AA	125 (57,1)	85 (68,5)	1,64 (1,03-2,61)	0,038*
rs1530300				
Alelo				
T	319 (73,1)	182 (71,6)	Referência	
C	117 (26,9)	72 (28,4)	1,08 (0,76-1,52)	0,72
Genótipo				
TT	118 (54,1)	67 (52,8)	Referência	
TC	83 (38,1)	48 (37,8)	1,02 (0,64-1,62)	0,99
CC	17 (7,8)	12 (9,4)	1,24 (0,56-2,76)	0,68
TC+CC	100 (45,9)	60 (47,2)	1,06 (0,68-1,64)	0,82

\* p<0,05: estatisticamente significativa.

## 9. DISCUSSÃO

As FL/P constituem os defeitos congênitos mais comuns da região de cabeça e pescoço. A sua alta ocorrência, os tratamentos cirúrgicos extensos, o envolvimento dentário, fonoaudiológico e psicológico, justificam a importância dos estudos que investigam os fatores etiológicos associados a esta anomalia<sup>15</sup>. As pesquisas genéticas têm obtido muitos avanços e identificado diversos genes candidatos e regiões de susceptibilidade para a ocorrência desses defeitos<sup>5,6,16,17,18</sup>.

A pesquisa dos polimorfismos rs560426, rs987525 e rs1530300 na população do estado da Bahia teve como o objetivo validar a associação destes SNPs com as FL/PNS já descritas em outras populações brasileiras, a exemplo da população do sul de Minas Gerais. A replicação

de estudos é uma prática comum na genética e tem o intuito de verificar se as associações sugeridas reproduzem-se em outras populações<sup>19</sup>.

Utilizou-se uma abordagem do tipo caso-controle, que tem como vantagens o baixo custo e a facilidade no recrutamento dos indivíduos afetados, sem a necessidade de incluir os seus familiares. Apesar destes benefícios, os resultados desta metodologia estão sujeitos às questões de heterogeneidade populacional<sup>20</sup>. Nesse desenho de estudo pode-se usar amostras pareadas, nas quais há um emparelhamento, em relação a algumas características. Nas amostras não pareadas, os casos e controles são agrupados de forma independente. Na nossa pesquisa, um estudo caso-controle não pareado, observou-se predomínio do sexo feminino no grupo controle. Este fato pode estar relacionado à maior procura de mulheres para atendimento odontológico nos serviços de saúde e também naqueles vinculados às instituições de ensino, onde foi realizada a coleta dos indivíduos controle<sup>21,22</sup>.

Uma das críticas frequentes dos estudos na área de polimorfismos genéticos em modelos caso-controle é a formação dos grupos quanto a sua composição étnica, por isso, a discriminação da ancestralidade parece ser essencial em populações heterogêneas<sup>3,8</sup>. No presente trabalho, a pesquisa da ascendência foi realizada e houve predomínio da ancestralidade europeia nos indivíduos fissurados e nos controles, embora tenha sido observada grande contribuição africana em ambos os grupos avaliados. A ancestralidade ameríndia foi menos frequente. Outros estudos genéticos na população brasileira de fissurados também confirmaram predominância de europeus nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste. Nesses trabalhos não havia amostras oriundas do estado da Bahia<sup>8,9</sup>. O predomínio da ancestralidade europeia da população brasileira foi observado por Pena *et al.* (2011)<sup>23</sup> no município de Ilhéus, Bahia e em outras regiões. Observaram que independente da região do país, a ascendência europeia foi mais predominante, com proporções que variaram de 60,6% a 77,7%. Foi sugerido que a imigração de seis milhões de europeus para o Brasil nos séculos 19 e 20, um processo descrito como o branqueamento do Brasil, foi responsável pela dissipação das diferenças ancestrais que refletiam a história da população de cada região brasileira.

O gene *ABCA4*, membro da superfamília ATP-ligante à fita transportadora, subfamília A, membro 4, está localizado no cromossomo 1p22.1 e é conhecido por sua associação às doenças autossômicas degenerativas da retina<sup>3,10</sup>. No presente estudo, não foi observada associação do polimorfismo rs560426 desse gene e a ocorrência de fissuras. Este resultado

não está em consenso com os achados da literatura. Beaty *et al.* (2010)<sup>10</sup>, por meio de análise de desequilíbrio de transmissão, encontraram associação positiva para esse polimorfismo (OR 1,432, IC 95%: 1,292–1,587) e as fissuras labiais e labiopalatinas, principalmente em indivíduos de ancestralidade asiática e europeia. Yuan *et al.*(2011)<sup>24</sup> também encontraram associação deste polimorfismo com as fissuras labiais e labiopalatinas, em indivíduos latino-americanos. Na população brasileira, foi demonstrada recentemente uma relação do SNP rs560426 com as fissuras labiais e labiopalatinas. Bagodarkis *et al.* (2013)<sup>9</sup> avaliaram este SNP em indivíduos oriundos do sul de Minas Gerais, caracterizados pela ancestralidade europeia, e observaram risco do alelo G (p=0,02; OR:1,34; IC 95%:1.08–1.66). Na população de fissurados provenientes do estado de São Paulo, foi demonstrado que a presença do alelo G também representa risco para as fissuras labiais e labiopalatinas. Nesse estudo, o genótipo homozigoto GG apresentou associação estatisticamente significativa<sup>24</sup>. Já as pesquisas realizadas em populações da Ásia<sup>26</sup>, Polônia<sup>4</sup> e África<sup>27</sup> não demonstraram associação para esse polimorfismo.

A região 8q24 tem sido considerada um dos principais *loci* de susceptibilidade para as fissuras nas populações europeias<sup>4</sup>. Apesar disso, os mecanismos biológicos pelos quais os polimorfismos nesta região exercem seus efeitos no desenvolvimento de FL/PNS ainda não estão claros. Por isso, alguns genes próximos a essa região estão sendo mapeados, como o *MYC* e o *GSDMC*, com o objetivo de identificar o papel dessas variantes na ocorrência de fissuras<sup>8,28</sup>. Na população estudada, observou-se que o polimorfismo rs987525, localizado nesta região, apresentou relação com a ocorrência de fissuras labiopalatinas. Estes resultados corroboram com estudos em populações da Polônia<sup>4</sup>, Filadélfia<sup>5</sup>, Europa Central<sup>6</sup>, EUA<sup>29</sup> e Estônia e Lituânia<sup>30</sup>. Na população brasileira, um estudo recente encontrou significância estatística entre o polimorfismo rs987525 e os portadores de fissuras labiais e labiopalatinas. Essa associação foi avaliada em dois grupos, um formado por populações de diferentes cidades do Brasil (Santarém, Fortaleza, Barbalha, Maceió e Rio de Janeiro) e outro, por fissurados oriundos de Alfenas, Minas Gerais. Observou-se que a presença do alelo A representou risco para a ocorrência de FL e FLP em ambos os grupos, quando comparados aos controles<sup>8</sup>. No nosso estudo, o alelo A foi associado apenas ao grupo portador de FLP. Em relação ao genótipo, observou-se risco para o AA, nos grupos FLP e FL+FLP. Já em investigações com amostras de pacientes do Quênia<sup>27</sup> e da Nigéria<sup>31</sup>, não foram encontradas

associações. É possível que a influência da etnia africana tenha contribuído para esses resultados.

Ainda na região 8q24, a presente pesquisa também avaliou o polimorfismo rs1530300. Não houve associação deste SNP com a ocorrência de fissuras. Este resultado não era esperado, já que nesse mesmo *loci* foi observado risco para as FLP no polimorfismo rs987525. Sugere-se que um pequeno número de indivíduos portadores do alelo variante, tenha influenciado nesses resultados. Acredita-se também que o efeito do polimorfismo rs987525 na ocorrência de fissuras foi marginal e talvez seja perdido com a ampliação da amostra. Grant *et al.* (2009)<sup>5</sup> estudaram o SNP rs1530300 na população da Filadélfia e encontraram associação com a ocorrência de fendas labiais e labiopalatinas. Em estudos de haplótipos nesta região cromossômica, foi observado desequilíbrio de ligação entre os alelos A e C dos polimorfismos rs987525 e rs1530300, respectivamente. De forma semelhante, Blanton *et al.* (2010)<sup>28</sup> revelaram uma significativa correlação entre os polimorfismos rs1530300 e FL/PNS, bem como uma associação positiva dos alelos de risco contidas em rs1530300 e rs987525. Na população do sul de Minas Gerais, caracterizada pela ancestralidade europeia, Bagodarkis *et al.* (2013)<sup>9</sup> analisaram apenas este polimorfismo da região 8q24 e encontraram forte associação. O alelo C foi significativamente correlacionado com o grupo de fissuras labiais e labiopalatinas, com um risco de 1,64.

Neste estudo observou-se que, apenas o SNP rs987525 da região cromossômica 8q24 mostrou associação com o grupo de portadores de fissuras labiopalatinas. Para as fendas labiais não foi observada associação nos polimorfismos analisados. Como explicar esses resultados, já que as evidências embriológicas demonstram que fissuras labiais e labioplatinas são variantes do mesmo defeito? Uma hipótese é que diferenças no número de amostras dos subfenótipos das fissuras interferiram nos resultados do nosso estudo. Durante 18 meses de coleta, obtivemos 127 indivíduos portadores de FLP, enquanto as fissuras labiais totalizaram 48 casos.

## 10. CONCLUSÕES

- A associação dos polimorfismos rs560426 e rs1530300 com as FL/PNS não foi confirmada na população do estado da Bahia.

- Dos polimorfismos estudados, apenas o SNP rs987525 foi associado às fissuras labiopalatinas.
- Resultados mais consistentes deverão ser obtidos com a ampliação da amostra de fissurados.

**ABSTRACT**

*SNPs rs987525 and rs1530300, both located on 8q24 and rs560426 polymorphism, belonging to the ABCA4 gene have been considered markers of risk for cleft lip and / or palate nonsyndromic (NSCL / P) in various populations. The realization of genetic mapping in admixed populations, such as the Brazilian has been poorly documented in relation to the polymorphism rs560426. The aim of this study was to identify individuals and fissured born residents in the state of Bahia (n = 179) the frequency of the allele and genotype polymorphisms rs987525, rs1530300, rs560426 and compares it to normal subjects (n = 221). The polymorphisms were genotyped by allelic discrimination method with fluorescent probes. No association was observed for rs560426 and rs1530300 polymorphisms in the occurrence of CL / P. Regarding the polymorphism rs987525 of 8q24, the presence of the allele showed 1.41 fold higher risk in the occurrence of CL / P compared to the C allele (95% CI 1.06 to 1.87, p = 0.02) . For the AA genotype the risk was 1.58 (95% CI 1.05 to 2.39, p = .04). In relation to cleft lip and palate (CLP) of the risk allele was 1.51 times compared to the C allele (95% CI 1.10 to 2.08, p = 0.011). For the AA genotype the risk was 2.17 (95% CI 1.15 to 4.10, p = 0.021). We conclude that the A allele of rs987525 polymorphism is associated with the development of FLP.*

*Keywords: Cleft lip, etiology, genetic polymorphism.*

**REFERÊNCIAS (P)**

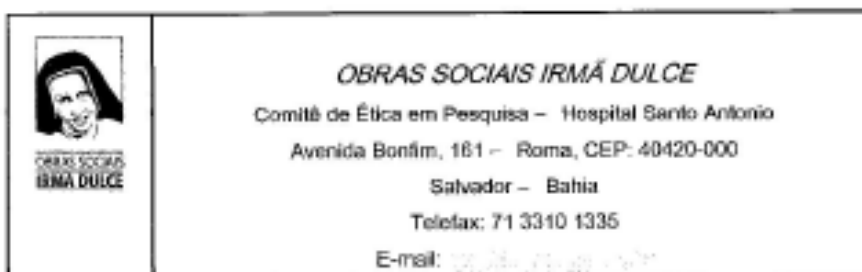
1. Harville EW, Wilcox AJ, Lie RT, Abyholm F, Vindenes H. Epidemiology of cleft palate alone and cleft palate with accompanying defects. *Eur J Epidemiol.* 2007;22(6):389-95. Epub 2007 May 5.
2. Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet.* 2009; 374(9703): 1773-85.
3. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011; 12:167-178.
4. Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicki P, Biedziak B, Paradowska P, Jagodzinski PP. Association between genetic variants of reported candidate genes or regions and risk of cleft lip with or without cleft palate in the Polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010 Jul; 88(7):538-45.
5. Grant SF, Wang K, Zhang H, *et al.* Genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr.* 2009; 155: 909-13.
6. Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, *et al.* Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2009; 41: 473-7.
7. Yildirim M, Seymen F, Deeley K, Cooper ME, Vieira AR. Defining Predictors of Cleft Lip and Palate Risk. *J Dent Res.* 2012; Apr 10.
8. Brito LA, Paranaíba LM, Bassi CF, Masotti C, Malcher C, Schlesinger D, Rocha KM *et al.* *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012 Jun;94(6):464-8.
9. Bagordakis E, Paranaíba LM, Brito LA, Aquino SA, Massetti AC, Martelli-Junior H *et al.* Polymorphisms at Regions 1p22.1 (rs560426) and 8q24 (rs1530300) Are Risk Markers for Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate in the Brazilian Population. *Am J Med Genet.* 2013; Part A 9999:1-4.
10. Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, *et al.* A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet.* 2010; 42: 525-9.
11. Sivertsen A, Wilcox AJ, Skjaerven R, Vindenes HA, Abyholm F, Harville E, Lie RT. Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ.* 2008 Feb 23;336(7641):432-4.
12. Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet.* 2006 Sep; 70(Pt):658-65.



13. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol.* 2009; Feb 15;169(4):505-14.
14. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000a; Jun; 155 (2):945-59.
15. Mossey PA, Little J. Epidemiology of oral clefts: an international perspective. In: Wyszynski DF, ed. *Cleft lip and palate: from origins to treatment.* New York: Oxford University Press, 2002: 127-58.
16. Mangold E, Reutter H, Birnbaum S, et al. Genome-wide linkage scan of nonsyndromic orofacial clefting in 91 families of central European origin. *Am J Med Genet A.* 2009; 149: 2680-94.
17. Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet.* 2010. 42: 24-6.
18. Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, et al. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered.* 2009; 68: 151-70.
19. Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *J Dent Res.* 2007 Oct;86(10):986-91.
20. Feitosa Mary F., Krieger Henrique. O futuro da epidemiologia genética de características complexas. *Ciênc. saúde coletiva.* 2002; 7(1): 73-83.
21. Silva CHV, Araújo ACS, Fernandes RSM, Alves KA, Pelinca RN, Dias YC. Profile of primary dental care of the Federal University of Pernambuco. *Odont Clín-Cientif.* 2009; 8 (3); 229-235.
22. Aquino, SN; Martelli, DRB; Laranjeira, AL; Bonan, PRF; Martelli-Junior, H. Concordância entre diagnóstico clínico e histopatológico de lesões bucais. *RGO.* 2010; 58 (3): 345-349.
23. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011 Feb 16;6(2):e17063
24. Yuan Q, Blanton SH, Hecht JT. Association of ABCA4 and MAFB with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Am J Med Genet A.* 2011 Jun;155A(6):1469-71.
25. Fontoura C, Silva RM, Granjeiro JM, Letra A. Further evidence of association of the ABCA4 gene with cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci* 2012; 120: 553–557.

26. Pan Y, Zhang W, Du Y, Tong N, Han Y, Zhang H, et al. Different roles of two novel susceptibility loci for nonsyndromic orofacial clefts in a Chinese Han population. *Am J Med Genet A*. 2011 Sep; 155A(9):2180-5.
27. Weatherley-White RC, Ben ST, Jin Y, Riccardi S, Arnold TD, Spritz RA. Analysis of genomewide association signals for nonsyndromic cleft lip/palate in a Kenya African cohort. *Am J Med Genet Part A*. 2011; 155A:2422-2425.
28. Murray T, Taub MA, Ruczinski I, Scott AF, Hetmanski JB, Schwender H, et al. Examining markers in 8q24 to explain differences in evidence for association with cleft lip with/without cleft palate between Asians and Europeans. *Genet Epidemiol*. 2012 May ; 36(4): 392–399.
29. Blanton SH, Burt A, Stal S, Mulliken JB, Garcia E, Hecht JT. Familybased study shows heterogeneity of a susceptibility locus on chromosome 8q24 for nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010; 88:256–259.
30. Nikopensius T, Ambrozaityte L, Ludwig KU, et al. Replication of novel susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24 in Estonian and Lithuanian patients. *Am J Med Genet*. 2009; 149A:2551–2553
31. Butali A, Mossey PA, Adeyemo WL, Jezewski PA, Onwuamah CK, Ogunlewe MO, et al. Genetic studies in the nigerian population implicate an MSX1 mutation in complex oral facial clefting disorders. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011 Nov; 48(6):646-53.

## ANEXO 1 – Protocolo da aprovação do comitê de Ética em Pesquisa



Of. CEP 133/2011

Salvador, 16 de novembro de 2011.

Sra. Silvia Regina Reis  
Pesquisadora Responsável

Prezada Senhora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Santo Antônio tomou conhecimento e aprovou *ad referendum* o **Protocolo de Pesquisa nº 69/11**, do estudo intitulado "**Estudo caso-controle sobre polimorfismos genéticos em fissuras lábio-palatinas não-síndromicas**", depois de analisada a resolução das pendências.

Reiteramos a necessidade de ser encaminhado relatório periódico até 16/Maio/2012 (6 meses após a aprovação) ou relatório final, se o término ocorrer antes dessa data.

Atenciosamente,



Janet Lima de Melo  
Coordenadora do CEP  
Hospital Santo Antônio