



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

ANA CAMILA PEREIRA MESSETTI

**ESTUDO MULTICÊNTRICO BRASILEIRO SOBRE A ASSOCIAÇÃO
ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES *CRISPD2* E *JARID2* E
FISSURAS ORAIS NÃO-SINDRÔMICAS**

**BRAZILIAN MULTICENTER STUDY OF ASSOCIATION BETWEEN
POLYMORPHISMS IN *CRISPD2* AND *JARID2* AND NONSYNDROMIC
ORAL CLEFTS**

Piracicaba

2016

ANA CAMILA PEREIRA MESSETTI

ESTUDO MULTICÊNTRICO BRASILEIRO SOBRE A ASSOCIAÇÃO
ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES *CRISPDL2* E *JARID2* E
FISSURAS ORAIS NÃO-SINDRÔMICAS

BRAZILIAN MULTICENTER STUDY OF ASSOCIATION BETWEEN
POLYMORPHISMS IN *CRISPDL2* AND *JARID2* AND NONSYNDROMIC
ORAL CLEFTS

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Estomatopatologia, na Área de Patologia.

Thesis presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of in Oral Medicine and Oral Pathology, in Pathology area.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA
CAMILA PEREIRA MESSETTI E ORIENTADA
PELO PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

Piracicaba

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 33003033009P4

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marlene Girello - CRB 8/6159

M563e Messetti, Ana Camila Pereira, 1980-
Estudo multicêntrico brasileiro sobre a associação entre polimorfismos nos genes *CRISPLD2* e *JARID2* e fissuras orais não-sindrômicas / Ana Camila Pereira Messetti. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Ricardo Della Coletta.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fenda labial. 2. Polimorfismo de nucleotídeo único. I. Della Coletta, Ricardo, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Brazilian multicenter study of association between polymorphisms in *CRISPLD2* and *JARID2* nonsyndromic oral cleft

Palavras-chave em inglês:

Cleft lip

Polymorphism single nucleotide

Área de concentração: Patologia

Titulação: Doutora em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Ricardo Della Coletta [Orientador]

Sofia Takeda Uemura

Silvia Regina de Almeida Reis

Carine Ervolino de Oliveira

Nilva de Karla Cervigne

Data de defesa: 22-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 22 de Julho de 2016, considerou a candidata ANA CAMILA PEREIRA MESSETTI aprovada.

PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

PROF^a. DR^a. SOFIA TAKEDA UEMURA

PROF^a. DR^a. SILVIA REGINA DE ALMEIDA REIS

PROF^a. DR^a. CARINE ERVOLINO DE OLIVEIRA

PROF^a. DR^a. NILVA DE KARLA CERVIGNE

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

À Deus, pela graça de permitir a realização deste trabalho e por fazer de mim, sal e luz, segundo sua vontade;

Ao meu orientador, homem de postura irrefutável, exemplo de dedicação e honestidade;

Ao meu esposo Luiz Marcelo, homem de muita ação e poucas teorias, mestre na arte de apoiar, pela presença, afeto e, pela paciência e renúncia que demonstrou durante a realização desta jornada, pelos esforços e privações que venceu para que minha formação fosse possível, um pai exemplar,

A minha filha, Valentina Rosa, o melhor presente de Deus, me devolveu a coragem, sua chegada transformou minha noite em dia, minha tristeza em alegria, você é o combustível que me leva a superar limites.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Della Coletta exemplo de dedicação e amor pela profissão, a quem tenho uma dívida intelectual, agradeço pela oportunidade, confiança, orientação e ensinamentos transmitidos. Este trabalho deve-se ao seu incentivo e apoio por todo o desenrolar deste estudo.

Aos queridos amigos que fiz em Piracicaba, em especial à Elizabete, Carine, Carolina, Mariana e Marcondes que tornaram esta jornada mais leve compartilhando as alegrias e, também, as dificuldades. Serão sempre os padrinhos da Valentina.

Ao meu amigo de bancada, Renato, a quem devo a maior parte deste trabalho. Sem sua dedicação, gentileza, altruísmo, coerência e paciência, nada teria sido possível;

A todos os pacientes que se dispuseram, com tanto desprendimento e generosidade, a participar desta pesquisa.

Agradecimentos

À **Universidade Estadual de Campinas** na pessoa de seu reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge** e à **Faculdade de Odontologia**, na pessoa de seu diretor **Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques**, onde me acolheram e concederam todos os recursos necessários para o desenvolvimento do presente trabalho.

À Presidente da **Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury** e ao **Programa de Pós-graduação em Estomatopatologia** na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes**, por me dar a oportunidade de fazer parte de sua ilustre equipe de trabalho, e por ter tido sempre uma participação ativa e estimuladora diante de cada passo dessa trajetória;

Aos Professores **Drs. Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Augustin Vargas, Ricardo Della Coletta, Oslei Paes de Almeida**, e **Profa. Dra. Tuula Anneli Salo**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Expresso a minha admiração pela competência e seriedade com que realizam suas funções de ensino e pesquisa nesta instituição, por me transmitir seus conhecimentos nas áreas da semiologia, patologia oral e biologia molecular, me fornecendo uma formação integral.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-**CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado;

Ao **PROCAD/Casadinho, CNPq** e **CAPES** pelo auxílio financeiro à pesquisa;

Aos meus amigos e companheiros de Laboratório: Carolina, Fernanda, Florence, Maurício, Rebeca, Renato e Rodrigo pelo apoio, amizade e por estarem sempre dispostos a dividir o que sabem;

Aos pós-graduandos do curso de Estomatopatologia Alicia, Ana Carolina, Camilla, Celeste, Ciro, Débora, Diego, Felipe, Harim, José Laurentino, Juscelino, Karina, Leonardo, Marcondes, Mariana, Marisol, Priscilla, Renata, Vinícius e Wagner pela convivência maravilhosa em Piracicaba;

Às pós-doutorandas, Dra Carine Ervolino de Oliveira, Dra Débora Campanello Bastos e à Dr Nilva Cervigne, pela grande colaboração, disponibilidade e pelos ensinamentos de laboratório transferidos no meu doutorado;

Por fim, a todas aquelas pessoas e instituições que aportaram seu carinho, tempo, recursos, conhecimentos e trabalho para a elaboração e conclusão da presente pesquisa... **Muito Obrigada!**

“Ao homem pertencem os planos do coração, mas do Senhor vem a resposta da língua. Todos os caminhos do homem lhe parecem puros, mas o Senhor avalia o espírito. Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos. O Senhor faz tudo com um propósito; até os ímpios para o dia do castigo. O Senhor detesta os orgulhosos de coração. Sem dúvida serão punidos. Com amor e fidelidade se faz expiação pelo pecado; com o temor do Senhor o homem evita o mal. Quando os caminhos de um homem são agradáveis ao Senhor, ele faz que até os seus inimigos vivam em paz com ele.”

Provérbios 16:1-7

RESUMO

Variantes nos genes *CRISPLD2* (cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2) e *JARID2* (jumonji, AT-rich interaction domain 2) foram associadas com um risco aumentado para o desenvolvimento de fissuras do lábio e/ou palato não-sindrômica (FL/PNS). Neste estudo caso-controle nós analisamos a possível associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *CRISPLD2* e *JARID2* na população brasileira com FL/PNS. Como a predisposição genética para as FL/PNS é dependente da composição étnica, nós realizamos uma análise estruturada levando em conta a variação da ancestralidade genômica de cada indivíduo. Quatro polimorfismos no gene *CRISPLD2* (rs1546124, rs8061351, rs2326398 e rs4783099) e 4 no gene *JARID2* (rs6915344, rs2299043, rs2237138 e rs2076056), previamente associados com FL/PNS, foram genotipados em 785 pacientes brasileiros com FL/PNS (549 com fissura labial com ou sem fissura palatina-FL±PNS e 236 com fissura palatina isolada-FPNS) e 693 indivíduos clinicamente normais. A distribuição genotípica de todos os SNPs no grupo controle respeitou o equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto o SNP rs6915344 no gene *JARID2* que foi excluído das análises posteriores. Após o ajuste para as diferenças na ancestralidade genômica, associações alélicas entre o polimorfismo rs2237138 no gene *JARID2* e uma diminuição no risco para FL±PNS (OR: 0,80; 95% IC: 0,67-0,97; p=0,02) e entre o alelo T do polimorfismo rs4783099 no gene *CRISPLD2* e um aumento no risco para FPNS (OR: 1,31; 95% IC: 1,05-1,62; p=0,01) foram observadas. Os SNPs no gene *CRISPLD2* não demonstraram desequilíbrio de ligação, enquanto que os SNPs no gene *JARID2* revelaram um forte desequilíbrio de ligação entre eles. Nossos resultados sugerem que o SNP rs2237138 no gene *JARID2* apresenta um efeito protetor contra FL±PNS, enquanto que o SNP rs4783099 no gene *CRISPLD2* representa um fator de risco para FPNS na população brasileira.

Palavras-chave: Fissura labial e/ou palatina não-sindrômica; polimorfismo de nucleotídeo único; CRISPLD2; JARID2.

ABSTRACT

Variants in the cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2 gene (*CRISPLD2*) and in the jumonji, AT-rich interaction domain 2 gene (*JARID2*) were previously shown to influence nonsyndromic oral cleft susceptibility. Herein, we performed a case-control study to examine the potential association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *CRISPLD2* and *JARID2* with nonsyndromic cleft lip and/or palate (NSCL/P) in the Brazilian population. Given the ethnicity-dependent genetic predisposition to NSCL/P, we performed a structured analysis taking into account the genomic ancestry variation of each individual. Four SNPs in *CRISPLD2* (rs1546124, rs8061351, rs2326398 and rs4783099) and 4 in *JARID2* (rs6915344, rs2299043, rs2237138 and rs2076056), that were previously reported to be associated with NSCL/P, were genotyped in 785 Brazilian patients with NSCL/P (549 with cleft lip with or without cleft palate-NSCL \pm P, and 236 with cleft palate only-NSCPO) and 693 unaffected Brazilian controls. Genomic ancestry was assessed with a set of 40 biallelic short insertion/deletion variants previously validated as ancestry informative markers of the Brazilian population. After adjustment of ancestry variations, allelic analysis revealed marginal associations between the *CRISPLD2* rs4783099 T allele and increased risk for NSCPO (OR: 1.31, 95% CI: 1.05-1.62, $p=0.01$) and between *JARID2* rs2237138 and decreased NSCL \pm P risk (OR: 0.80, 95% CI: 0.67-0.97, $p=0.02$). No linkage disequilibrium was found between *CRISPLD2* SNPs, while *JARID2* SNPs were in complete linkage disequilibrium. Our results suggest that *CRISPLD2* rs4783099 may represent a risk factor for NSCPO while *JARID2* rs2237138 shows a protective effect against NSCL \pm P in the Brazilian population.

Keywords: Cleft lip and/or palate; single nucleotide polymorphism; CRISPLD2; JARID2.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 ARTIGO: Brazilian Multicenter study of association between polymorphisms in CRISPLD2 and JARID2 and nonsyndromic oral clefts	19
3 DISCUSSÃO	41
4 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXOS	54
Anexo 1 – Certificado em Ética em Pesquisa	54
Anexo 2 – Certificado de Submissão do Artigo	55

1 INTRODUÇÃO

A fissura do lábio e/ou palato (FL/P) é um dos defeitos congênitos mais comuns em humanos, sendo caracterizado por áreas de descontinuidade no lábio e/ou palato (Lidral *et al.*, 2008, Dixon *et al.*, 2011; Marazita, 2012). Geneticamente, as fissuras são divididas em dois grupos distintos: sindrômicas e não-sindrômicas (Cobourne, 2004). Cerca de 70% dos casos de FL/P ocorrem de maneira não-sindrômica (FL/PNS), ou seja, sem malformações adicionais, e os demais 30% referem-se às associações, com padrões mendelianos, cromossômicos ou condições esporádicas. Existem mais de 500 síndromes relacionadas com FL/P como característica fenotípica (Meng *et al.*, 2009; Mangold *et al.*, 2011). As FL/P são as deformidades faciais mais comuns em todas as raças e grupos étnicos, provavelmente devido à grande complexidade dos eventos envolvidos na formação da face (Prescott & Malcolm, 2002; Stanier & Moore, 2004; Mirfazeli *et al.*, 2012) e representam uma das principais causas de mortalidade infantil nos países subdesenvolvidos (Dixon, 2011; Murray *et al.*, 2012; Rahimov *et al.*, 2012; Falagan-Lotsh *et al.*, 2015). Em geral, as populações asiáticas e ameríndias possuem uma alta prevalência (1:500), as populações europeias possuem prevalência intermediária (1:1000) e as menores taxas de prevalência são observadas em africanos e descendentes de africanos (1:2500) (Mossey & Little, 2002; Murthy & Bhaskar, 2009; Mossey & Little, 2009). No Brasil, a prevalência das FL/PNS tem sido relatada entre 0,36 e 1,54 para cada 1000 nascidos vivos, com aproximadamente 4000 novos casos anuais (Martelli-Junior *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009).

As fissuras orofaciais podem ser classificadas com base nas estruturas anatômicas afetadas em fissuras pré-forame incisivo ou fissuras labiais (FL), fissuras pós-forame incisivo ou fissuras palatinas (FP), fissuras transforame incisivo ou fissuras lábio-palatinas (FLP) e fissuras raras da face (Spina *et al.*, 1972). Baseado em evidências embriológicas e epidemiológicas, as FLs e FLPs são consideradas variantes do mesmo defeito e classificadas como um único grupo, designado FL±P (fissura labial com ou sem fissura palatina), enquanto que as FPs são classificadas como uma entidade distinta (Mitchell *et al.*, 2002). A frequência de FL/PNS difere de acordo com o gênero. FLP e FL são mais frequentes no gênero masculino e a FP é mais comum no gênero feminino (Mossey & Little, 2002; Martelli *et al.*, 2008; Mossey & Little, 2009).

FL/P são associadas à significativa morbidade, com complicações associadas à estética, fala, audição e funções orais, resultando em condições adversas para a saúde e integração social (Mossey *et al.*, 2009; Leslie & Marazita 2013). Os indivíduos afetados necessitam de reabilitação bem sucedida que abrangem abordagens multidisciplinares desde o nascimento até a vida adulta (Wehby & Cassell, 2010). Embora a reabilitação seja possível com o atendimento de boa qualidade, as FL/P inevitavelmente representam despesa elevada para o indivíduo, para a família e para a sociedade, com um custo substancial em termos de saúde e serviços relacionados (Dixon *et al.*, 2011).

A etiologia das fissuras orais é complexa, multifatorial e atribuída a fatores genéticos e ambientais (Dixon *et al.*, 2011). Apesar dos esforços, a compreensão da etiologia acerca das variantes não-sindrômicas ainda permanece desconhecida. Muitos estudos genéticos utilizando diferentes estratégias, incluindo estudos de ligação, caso-controle ou com trios, sequenciamento direto do DNA e mais recentemente, estudos de associação de larga escala genômica (do inglês *genome-wide association study*, GWAS), baseados na comparação de vários polimorfismos comuns entre casos e controles, identificaram vários genes e regiões cromossômicas candidatos à etiologia das FL/PNS, mas apenas 2 destes foram reproduzidos em diferentes populações, os quais estão localizados no gene *IRF6* (*interferon regulatory factor 6*) (Birnbbaum *et al.*, 2009) e em uma região intergênica na região 8q24 (Grant *et al.*, 2009). Estudos confirmaram a associação do locus 8q24 na população brasileira com ancestralidade Europeia (Brito *et al.*, 2012a; Bagordakis *et al.*, 2013), mas não nos indivíduos com elevada ancestralidade Africana (Borges *et al.*, 2015), e a participação do gene *IRF6* é discutida (Paranaíba *et al.*, 2010; Brito *et al.*, 2012b; Borges *et al.*, 2015; de Souza *et al.*, 2015). Depois de cinco séculos de miscigenação entre Ameríndios, Europeus e Africanos Subsaarianos, a alta variabilidade da ancestralidade genômica da população brasileira afeta tanto a suscetibilidade genética para o desenvolvimento das fissuras orais (de Aquino *et al.*, 2014b) como as associações específicas identificadas em outras populações (Bagordakis *et al.*, 2013; Filézio *et al.*, 2013; Paranaíba *et al.*, 2013; de Aquino *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2015).

Durante a embriogênese, a formação da face baseia-se na interação de muitos eventos coordenados que envolvem os processos de diferenciação e crescimento celular, proliferação, transição epitélio-mesenquimal, apoptose, adesão

celular e sinalização inter e intracelular (Stanier & Moore, 2004), e variações polimórficas em genes que controlam estes eventos podem afetar o desenvolvimento normal dos lábios e palato, resultando nas FL/PNS (Butali *et al.*, 2011).

O início da formação do lábio se dá na quarta semana de gestação quando os primórdios faciais são originados a partir da migração das células da crista neural provenientes do tubo neural anterior. Dela surge o processo nasal medial e lateral, que se fusionam ao processo maxilar para formar a parte central do lábio superior, o palato primário e o nariz. O palato secundário começa a ser formado durante a sexta semana. Inicialmente, as placas palatinas do palato secundário aparecem como duas extensões no lado interno da maxila, ao longo da superfície lateral da língua. Na nona semana gestacional, ambas as placas palatinas sofrem uma rápida transformação horizontal, movendo-se sobre a língua e fusionando-se uma com a outra e com o septo nasal. Em seguida, o mesênquima palatino se diferencia em elementos musculares e ósseos que correlacionam com a posição do palato mole e duro, respectivamente. Na décima semana da embriogênese, os processos fusionados provenientes do palato primário e secundário e do septo nasal estão completos. Assim, o desenvolvimento do palato secundário em mamíferos divide o espaço oronasal em cavidades oral e nasal, permitindo que a mastigação e a respiração sejam realizadas simultaneamente (Sperber, 2002). Em razão da alta complexidade no desenvolvimento do lábio e palato, ainda não se conhece todos os mecanismos relacionados à falha na coalescência dos processos que dão origem a essas estruturas, assim, a fissura pode ser decorrente de qualquer distúrbio nos mecanismos biológicos que regulam esses processos durante a embriogênese seja ela intrínseca (genética) ou extrínseca (ambiental). Neste contexto, a busca por variantes genéticas em genes com participação nestes eventos durante a morfogênese normal do lábio e palato tem sido objeto de intensa investigação (Dixon *et al.*, 2011; Kohli e Kohli, 2012; Rahimov *et al.*, 2012; Butali *et al.*, 2014).

Estudos prévios relatam o envolvimento dos genes *CRISPLD2* (*cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2*) e *JARID2* (*jumonji, AT-rich interaction domain 2*) na etiologia das FL/PNS (Scapoli *et al.*, 2010; Chiquet *et al.*, 2011). A função biológica do gene *CRISPLD2*, localizado no cromossomo 16.q24.1, ainda permanece incerta (Chiquet *et al.*, 2011). Este gene pertence à superfamília CAP (*cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 protein*)

envolvida na mediação dos eventos intracelulares de apoptose (Girardi *et al.*, 2011). Alguns estudos relatam a expressão deste gene na região mandibular, palatina e nasofaríngea de camundongos durante o desenvolvimento craniofacial (Chiquet *et al.*, 2007). O domínio LCCT é comum a outros genes conhecidos como *COCH* (*coagulation factor C homolog*), Akhirin e CLCP1 (*LCCL-homology coagulation factor V/VIII homology domains protein*) (Trexler *et al.*, 2000 e Ahsan *et al.*, 2005) e estudos sugerem que tais domínios são do tipo estrutural ou imunológicos envolvidos na motilidade celular (Trexler *et al.*, 2000; Ahsan *et al.*, 2005; Liepinsh *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2007), que em conjunto com a apoptose, representam os mecanismos celulares responsáveis pela eliminação das células epiteliais da borda medial antes da fusão dos processo palatinos (Chai & Maxson, 2006). Um estudo realizado por Kent e colaboradores em 2002 observou a existência que um segundo gene, o *CRISPLD1*, que é homólogo ao gene *CRISPLD2* (70% em nível de nucleotídeos e 58% em nível de peptídeos). Embora a função exata do gene *CRISPLD1* também permaneça desconhecida, especula-se que ambos contenham mais resíduos de cisteína (Law *et al.*, 2006), aminoácido sintetizado na via de folato (Aguilar *et al.*, 2004) e essencial para a síntese proteica, divisão celular, crescimento tecidual e metilação do DNA (Boyles *et al.*, 2006). Existem relatos de que genes relacionados direta ou indiretamente com a via metabólica do folato parecem desempenhar um papel importante na etiologia das malformações congênitas como as FL/PNS (Mills *et al.*, 2008; Bufalino *et al.*, 2010). Dessa forma, especula-se que alterações na via do folato poderiam afetar a produção de cisteína, resultando em defeitos sobre a síntese e/ou função dos genes *CRISPLD* (Chiquet *et al.*, 2011).

Poucos estudos avaliaram a associação entre o gene *CRISPLD2* e FL/PNS e os resultados conflitantes são baseados nas diferenças populacionais. Evidências para um envolvimento do locus 16q.24, no qual *CRISPLD2* está contido, na etiologia das FL/PNS foi relatada por Chiquet e colaboradores (2007) em um estudo de larga escala incluindo populações caucasianas e hispânicas. No entanto, um estudo de validação subsequente realizado por Letra e colaboradores (2011) não observou associação entre FL/PNS em populações asiáticas e miscigenadas, enquanto relatou evidências de associação entre *CRISPLD2* e FL/PNS em uma população caucasiana brasileira e americana. Adicionalmente, um estudo realizado com uma população chinesa reforçou a hipótese de associação entre o gene *CRISPLD2* e as FL/PNS (Shi *et al.*, 2010). Ao contrário, um estudo com uma população italiana não

encontrou associação entre polimorfismos no gene *CRISPLD2* e FL/PNS (Girardi *et al.*, 2011). Os resultados conflitantes entre a associação do gene *CRISPLD2* e FL/PNS podem ser dependentes das estruturas étnicas das populações.

O gene *JARID2* está localizado no cromossomo 6p e é responsável por codificar uma proteína com função de fator de transcrição (Berge-Lefrank *et al.*, 1996). A proteína ARID codificada pelo gene *JARID2* tem diferentes nomenclaturas na literatura, ou seja, a proteína é também conhecida como Jumoji ou *JMJ* e possui um domínio de ligação ao DNA (ARID) e dois domínios *Jmj* conservados (*JmjC* e *JmjN*), essenciais para o desenvolvimento embrionário (Takeuchi *et al.*, 1995; Berge-Lefrank *et al.*, 1996; Pasini *et al.*, 1999; Topping *et al.*, 2002), formação de células tronco embrionárias (Passini *et al.*, 2010), formação do tubo neural (Takeuchi *et al.*, 1995; Berge-Lefrank *et al.*, 1996), desenvolvimento do fígado e hematopoiese (Jung *et al.*, 2005). O domínio de ligação ao DNA chamado de ARID (AT-rich interaction domain) é essencial para a regulação da atividade transcricional. Existem relatos de proteínas que contêm este domínio participarem de processos biológicos importantes, embora a função fisiológica da maioria dessas proteínas permaneça desconhecida (Toyoda *et al.*, 2000). Toyoda e colaboradores (2000) relataram a localização nuclear de *Jmj* e seu papel na regulação negativa do crescimento celular durante o desenvolvimento embrionário de camundongos. A expressão de *JARID2* foi detectada em diferentes estruturas craniofaciais de embriões humanos como palato e lábio entre a quarta e oitava semanas de gestação (Park *et al.*, 2006). Uma elevada expressão de *JARID2* foi também detectada em células epiteliais da cavidade nasal e do processo palatino destacando seu possível papel na etiologia das FL/PNS (Scapoli *et al.*, 2010). A função do gene *JARID2* não está totalmente esclarecida, no entanto, Takahashi e colaboradores (2004) demonstraram que a mutação em *JARID2* é associada com a ocorrência de anormalidades morfológicas no tubo neural e defeitos cardíacos, incluindo via dupla de saída do ventrículo direito e defeitos no septo interventricular e letalidade embrionária em camundongos. É importante ressaltar que o septo ventricular cresce e se funde com o endocárdio inferior, dividindo assim, o ventrículo em duas câmaras, processo o qual compartilha algumas homologias com o desenvolvimento do palato (Olson, 2004). Isso reforça a hipótese da participação de *JARID2* na etiologia das FL/PNS. Além disso, trabalhos recentes demonstraram que *JARID2* interage com o gene *PRC2* (*Polycomb-Repressive Complex 2*) que regula padrões de expressão que influenciam o estado

da cromatina através da metilação da histona H3. O complexo *JARID2/PRC2* promove seletivamente a ligação ao DNA e regula negativamente a metilação das histonas (Peng *et al.*, 2009; Pasini *et al.*, 2010). Além disso, *JARID2* é capaz de se ligar a diferentes sequências de DNA e tem sido proposto que seus efeitos podem estar associados com a combinação com outros fatores de transcrição (Kim *et al.*, 2003; Pasini *et al.*, 2010). Um estudo de desequilíbrio de ligação de base familiar revelou que haplótipos formados por variações polimórficas no gene *JARID2* estão associadas a etiopatogenia das FL/PNS (Scapoli *et al.*, 2010). No entanto, uma fraca associação entre polimorfismos do gene *JARID2* e FL/PNS foi detectada em uma população chinesa (Hao *et al.*, 2015), sugerindo possíveis influências da composição étnica da população na influência do gene no desenvolvimento das FL/PNS.

PROPOSIÇÃO

Determinar a associação dos polimorfismos rs4783099, rs2326398, rs1546124 e rs8061351 no gene *CRISPLD2* e rs6915344, rs2299043, rs2237138 e rs2076056 no gene *JARID2* com a suscetibilidade para o desenvolvimento das FL/PNS na população brasileira, após correção das diferenças na ancestralidade genômica.

2 ARTIGO

Artigo submetido na revista Journal of Oral Pathology & Medicine.

Brazilian multicenter study of association between polymorphisms in *CRISPLD2* and *JARID2* and nonsyndromic oral clefts

Ana Camila Messetti¹, Renato Assis Machado¹, Carine Ervolino de Oliveira¹, Hercílio Martelli-Júnior², Silvia Regina de Almeida Reis³, Helenara Salvati Bertolossi Moreira⁴, Darlene Camati Persuhn⁵, Tao Wu⁶, Ricardo D. Coletta¹

¹*Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil;* ²*Stomatology Clinic, Dental School, State University of Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil, and Center for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, Dental School, University of José Rosario Vellano, Alfenas, Minas Gerais, Brazil;* ³*Department of Basic Science, Bahiana School of Medicine and Public Health, Salvador, Bahia, Brazil;* ⁴*Department of Physiotherapy, State University of Western Paraná, Paraná, Brazil;* ⁵*Molecular Biology Department, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil;* ⁶*Peking University School of Public Health, Beijing, China.*

Running title: *CRISPLD2* and *JARID2* in nonsyndromic oral clefts.

Correspondence to:

Ricardo D. Coletta, Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry, State University of Campinas, CEP 13414-018, Piracicaba, São Paulo, Brazil. E-mail: coletta@fop.unicamp.br

BACKGROUND: Variants in the cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2 gene (*CRISPLD2*) and in the jumonji, AT-rich interaction domain 2 gene (*JARID2*) were previously shown to influence nonsyndromic oral cleft susceptibility. Herein, we performed a case-control study to examine the potential association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *CRISPLD2* and *JARID2* with nonsyndromic cleft lip and/or palate (NSCL/P) in the Brazilian population. Given the ethnicity-dependent genetic predisposition to NSCL/P, we performed a structured analysis taking into account the genomic ancestry variation of each individual.

METHODS: Four SNPs in *CRISPLD2* (rs1546124, rs8061351, rs2326398 and rs4783099) and 4 in *JARID2* (rs915344, rs2299043, rs2237138 and rs2076056), that were previously reported to be associated with NSCL/P, were genotyped in 785 Brazilian patients with NSCL/P (549 with cleft lip with or without cleft palate-NSCL±P, and 236 with cleft palate only-NSCPO) and 693 unaffected Brazilian controls. Genomic ancestry was assessed with a set of 40 biallelic short insertion/deletion variants previously validated as ancestry informative markers of the Brazilian population.

RESULTS: After adjustment of ancestry variations, allelic analysis revealed marginal associations between the *CRISPLD2* rs4783099 T allele and increased risk for NSCPO (OR: 1.31, 95% CI: 1.05-1.62, p=0.01) and between *JARID2* rs2237138 and decreased NSCL±P risk (OR: 0.80, 95% CI: 0.67-0.97, p=0.02). Haplotype analysis indicated a lack of association between *JARID2* haplotypes and nonsyndromic oral cleft risk.

CONCLUSIONS: Our results suggest that *CRISPLD2* rs4783099 may represent a risk factor for NSCPO while *JARID2* rs2237138 shows a protective effect against NSCL±P in the Brazilian population.

Keywords: Cleft lip and/or palate; single nucleotide polymorphism; *CRISPLD2*; *JARID2*.

Introduction

Nonsyndromic oral clefts are among the most common birth defects worldwide with a prevalence of 1.43:1000 live births (1). Among Brazilian newborns, the prevalence has been reported between 0.36 to 1.54:1000 live births, with approximately 4,000 new cases every year (2, 3). Based on epidemiologic features and embryologic timing, nonsyndromic oral clefts are divided in two distinct entities, nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL±P) and nonsyndromic cleft palate only (NSCPO). The etiology of nonsyndromic oral clefts is attributed to interplay of genetic and environmental factors, but the exact interactions are poorly known (1).

Previous studies have described an association between nonsyndromic oral clefts and genetic variations in the cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2 gene (*CRISPLD2*) (4) and in the jumonji, AT-rich interaction domain 2 gene (*JARID2*) (5). The biological functions of *CRISPLD2* remain uncertain, though belonging to the CAP (cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 protein) superfamily, which is involved in mediating cell adhesion and motility, apoptosis and regulating the extracellular matrix during morphogenesis (6), it is suggested that *CRISPLD2* is essential for normal craniofacial development (4). Indeed, zebrafish studies revealed that *CRISPLD2* is important for normal migration, differentiation and survival of neural crest cells during early craniofacial development, and alterations in *CRISPLD2* protein levels disturb palate and jaw development (7, 8). The *JARID2* gene encodes an ARID transcription factor, with essential functions during embryogenesis (9), maintenance of stem cells (10) and hematopoiesis (11). *JARID2* expression has been detected in different human craniofacial structures including the lip and palate between the fourth and eighth weeks of gestation (12). High expression levels of *JARID2* have been also detected in the epithelial cells of the palatine processes, highlighting its possible role in the etiology of oral clefts (5).

Although there is strong evidence for a participation of both *CRISPLD2* and *JARID2* in the pathogenesis of nonsyndromic oral clefts, few studies have explored this association and the results are conflicting based on population differences (4, 5, 13-19). Brazilian individuals have a highly variable genomic ancestry (20), which affects genetic susceptibility to nonsyndromic oral clefts (21-23). For example, while the involvement of interferon regulatory factor 6 (*IRF6*) and other nonsyndromic oral

cleft loci identified in other populations remains uncertain in the Brazilian population (21-25), previous studies confirmed the association of the 8q24 with NSCL±P in groups with high European backgrounds (21, 26) but not in a group of Brazilians with NSCL±P carrying a high genetic proportion of African ancestry (23). An additional study in a Brazilian population found significant association between *IRF6* rs2235371 and complete left cleft lip and palate, and the rs2073487, an intronic marker in *IRF6*, showed a trend for association with complete left cleft lip and palate (27). Therefore, the aim of the current study was to investigate potential associations of nonsyndromic oral cleft susceptibility signals previously identified in *CRISPLD2* and *JARID2* in a Brazilian population through a case-control structured analysis in which the genetic ancestry variation of each individual was taken into account.

Material and Methods

Sample study

This study included 1,478 individuals of which 549 had NSCL±P, 236 had NSCPO and 693 were unrelated healthy controls. The samples were collected in 4 different centers for rehabilitation of craniofacial anomalies in Brazil: the Association of Carrier of Cleft Lip and Palate-APOFILAB, Cascavel-PR (located in the South of Brazil), the Center for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of José Rosário Vellano, Alfenas-MG (located in the Southeastern region of Brazil), the University Hospital of Lauro Wanderley-HULW, João Pessoa-PB and the Santo Antonio Hospital, Salvador-BA, which are located in the Northeastern region. All patients with orofacial cleft were carefully evaluated by experts of each center, diagnosed independently and screened for the presence of anomalies and associated syndromes. Only patients with nonsyndromic forms of oral clefts were included in this study. The nonsyndromic oral clefts were classified with the incisive foramen as reference. The control group was composed of healthy individuals with no physical illness, psychiatric, birth defects or with a family history of orofacial clefts. The control group consisted of samples from the same geographic areas (Table 1). The study was approved by the ethics review board of each of the centers or hospitals affiliated with the collaborative study. Written informed consent was obtained from the parents or guardians and/or the participants.

Table 1. Characteristics of study controls and patients.

	Control (n=693)	NSCL±P (n=549)	NSCPO (n=236)
Age (years)	25.8±11.1	21.4±14.6	14.5±11.7
Gender			
Male	372 (53.7%)	247 (45%)	146 (61.9%)
Female	321 (46.3%)	302 (55%)	90 (38.1%)
Ancestry			
European	84.3%	82.0%	76.4%
African	14.0%	16.2%	21.4%
Amerindian	1.7%	1.8%	2.2%

DNA isolation

The genomic DNA was isolated from buccal mucosa cells obtained by mouthwash with a 3% sucrose solution, using a salting-out protocol previously described (28).

Single-nucleotide polymorphism (SNP) selection and Genotyping

Four SNPs (rs1546124, rs8061351, rs2326398 and rs4783099) in *CRISPLD2*, located at 16q24.1, and 4 SNPs (rs6915344, rs2299043, rs2237138 and rs2076056) in *JARID2*, which is located at 6p24-p23, were included in this study. These SNPs were selected because they were previously identified as susceptibility signals for orofacial clefts in other populations (4, 5) and show a minor allele frequency (MAF) >0.2. The main features of each SNP, including localization within gene, identification of the major and minor alleles and MAF, are described in Table 2.

The SNPs were genotyped with TaqMan-exonuclease allelic discrimination assays, which were obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

through their Assay-on-Demand service. For quality control purposes, reactions were randomly repeated in 10% of the samples for each SNP, and the concordance rate was 100%. All samples were successfully genotyped, with a genotype call rate of 100%.

Table 2. Characteristics of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) included in this study.

Gene	SNP	Position	Allele	MAF
<i>CRISPLD2</i>	rs1546124	84838445	A/g	0.340
	rs8061351	84849496	T/c	0.406
	rs2326398	84869111	A/g	0.448
	rs4783099	84907723	C/t	0.390
<i>JARID2</i>	rs6915344	15240213	C/t	0.468
	rs2299043	15456939	T/a	0.264
	rs2237138	15463164	A/g	0.207
	rs2076056	15487551	C/g	0.201

MAF: minor allele frequency. Minor allele in lower case. Source: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Estimation of the genomic ancestry

To characterize the European, African and Amerindian ancestry contributions, samples were genotyped with a panel of 40 biallelic short insertion/deletion polymorphisms (INDELs) previously validated as discriminative markers of the Brazilian colonizers (29). A FAM-labeled M13 tail was incorporated in the forward primers, allowing multiplex PCR, with 5 to 6 markers per reaction. PCR products were mixed with the GeneScan **600 LIZ size standard** (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), denatured and subjected to capillary electrophoresis using the ABI

Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Fragment analysis was performed with GeneMapper software version 4.1.

Statistical analysis

The genomic ancestry of each subject of this study was determined with the aid of Structure software version 2.3.4 (30), assuming the tri-hybrid origin of the Brazilian population. Samples with a prespecified population of origin (Amerindian, European, and sub-Saharan African reference populations from the Marshfield Clinic Collection) were incorporated to assist the software in the ancestry estimation. Following ancestry assessment, STRAT was used to test the association based on the individual ancestry proportions (31).

Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was assessed through chi-square test, and p value ≤ 0.05 was considered significant for derivation. The odds ratio (OR) associated with a 95% confidence interval (95% CI) was calculated, and the genotypes were analyzed under unrestricted, dominant, and recessive genetic models. Haplotype frequencies and pair-wise linkage disequilibrium (D' and r^2) were estimated using the HaploView software. The Bonferroni correction for multiple comparisons was applied, and the corrected p value of ≤ 0.007 ($0.05/7$ polymorphic markers) was considered statistically significant. Power for detecting a p value ≤ 0.05 for each SNP was estimated using the QUANTO software assuming a prevalence of NSCL/P in Brazil of 0.00146 (2).

Results

The average ancestry contributions in the control group were estimated at 84.3% of European, 14.0% of African and 1.7% of Amerindian, those in the NSCL±P group were 82.0% of European, 16.2% of African and 1.8% of Amerindian, and those in the NSCPO group were 76.4% of European, 21.4% of African and 2.2% of Amerindian (Table 1). There were no significant differences in the ancestry proportions between control and NSCL±P ($p=0.32$) and between NSCL±P and NSCPO ($p=0.18$), but the

proportion of African ancestry was significantly higher in the NSCPO group in comparison with control group ($p=0.02$).

For all SNPs, the distributions of genotypes in the control group were consistent with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium (Tables 3 and 4), except for rs6915344 which was excluded from further analysis. The frequencies of the alleles and genotypes structured by genomic ancestry are presented in Tables 3 and 4.

Associations between the rs4783099 T allele and TT genotype of *CRISPLD2* were detected. The T allele was identified in 36.5% of the control sample and in 42.9% of the NSCPO sample, revealing an increased risk to NSCPO (OR: 1.31, 95% CI: 1.05-1.62, $p=0.01$). The rs4783099 TT genotype was also more frequent in the NSCPO group than in the control group ($p=0.04$). Homozygosity for the *CRISPLD2* rs4783099 SNP demonstrated an OR of 1.51 (95% CI: 1.00-2.27). However, after Bonferroni correction for the number of variants tested, any association remained. The allele and genotype distribution of other *CRISPLD2* SNPs did not show any significant association with NSCL \pm P risk, except for rs8061351 at homozygosity, which was more frequent in NSCL \pm P than in the control group (OR: 1.34, 95% CI: 1.01-1.79, $p=0.04$).

The G allele of rs2237138 in *JARID2* was more frequent in the control group than in NSCL \pm P patients, showing a tendency towards association (OR: 0.80, 95% CI: 0.67-0.97, $p=0.02$). Similarly, the genotype GG was more frequent in the control group, with OR 0.61 (95% CI: 0.37-1.01, $p=0.05$). However, in both situations the p-value did not withstand Bonferroni correction for multiple tests.

Table 3. Association of the single-nucleotide polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL±P) after correction for ancestry.

	HWE (p value)	Control Grup (%)	NSCL±P Group (%)	OR _{allele} (95% CI) p value	OR _{Het} (95% CI) p value	OR _{Hom} (95% CI) p value	OR _{Dom} (95% CI) p value	OR _{Rec} (95% CI) p value
rs1546124								
Allele (A/G)	0.57	67.8/32.2	67.4/32.6	1.02 (0.86-1.21)	0.94 (0.77-1.16)	1.14 (0.81-1.62)	0.99 (0.87-1.13)	1.01 (0.86-1.19)
Genotype (AA/AG/GG)		46.4/42.7/10.9	47.2/40.4/12.4	0.83	0.59	0.45	0.93	0.88
rs8061351								
Allele (T/C)	0.34	59.2/40.8	57.5/42.5	1.07 (0.91-1.26)	0.85 (0.69-1.04)	1.34 (1.01-1.79)	0.97 (0.85-1.11)	1.04 (0.89-1.20)
Genotype (TT/TC/CC)		34.1/50.1/15.8	36.2/42.6/21.2	0.39	0.11	0.04	0.66	0.58
rs2326398								
Allele (A/G)	0.54	62.3/37.7	63.8/36.2	0.93 (0.79-1.11)	0.96 (0.78-1.17)	0.96 (0.70-1.32)	1.02 (0.90-1.16)	0.96 (0.82-1.12)
Genotype (AA/AG/GG)		39.4/45.9/14.7	41.8/44.0/14.2	0.45	0.68	0.82	0.72	0.61
rs4783099								
Allele (C/T)	0.07	63.5/36.5	64.4/35.6	0.96 (0.81-1.13)	1.00 (0.82-1.22)	0.92 (0.64-1.31)	1.01 (0.89-1.15)	0.97 (0.83-1.14)
Genotype (CC/CT/TT)		38.8/49.5/11.7	39.7/49.5/10.8	0.64	0.99	0.64	0.83	0.74
rs2299043								
Allele (T/A)	0.69	70.8/29.2	72.8/27.2	0.90 (0.75-1.08)	1.03 (0.83-1.26)	0.70 (0.45-1.08)	1.03 (0.91-1.16)	0.93 (0.78-1.10)
Genotype (TT/TA/AA)		50.4/40.7/8.9	51.9/41.9/6.2	0.26	0.79	0.11	0.64	0.39
rs2237138								
Allele (A/G)	0.81	72.7/27.3	76.9/23.1	0.80 (0.67-0.97)	0.93 (0.75-1.16)	0.61 (0.37-1.01)	1.05 (0.93-1.19)	0.85 (0.71-1.02)
Genotype (AA/AG/GG)		52.8/40.0/7.2	58.2/37.4/4.4	0.02	0.54	0.05	0.38	0.07
rs2076056								
Allele (C/G)	0.75	73.8/26.2	75.1/24.9	0.93 (0.77-1.12)	1.05 (0.85-1.30)	0.67 (0.41-1.10)	1.02 (0.90-1.15)	0.94 (0.79-1.13)
Genotype (CC/CG/GG)		54.7/38.2/7.1	55.0/40.2/4.8	0.45	0.64	0.11	0.77	0.56

Table 4. Association of the single-nucleotide polymorphisms with nonsyndromic cleft palate only (NSCPO) after correction for ancestry.

	HWE (p value)	Control Grup (%)	NSCPO Group (%)	OR _{allele} (95% CI) p value	OR _{Het} (95% CI) p value	OR _{Hom} (95% CI) p value	OR _{Dom} (95% CI) p value	OR _{Rec} (95% CI) p value
rs1546124								
Allele (A/G)	0.57	67.8/32.2	71.5/28.5	0.83 (0.66-1.05)	0.92 (0.70-1.22)	0.80 (0.48-1.34)	1.05 (0.89-1.24)	0.88 (0.71-1.10)
Genotype (AA/AG/GG)		46.4/42.7/10.9	51.7/39.6/8.7	0.13	0.58	0.39	0.52	0.27
rs8061351								
Allele (T/C)	0.34	59.2/40.8	63.2/36.8	0.84 (0.68-1.05)	0.92 (0.71-1.20)	0.86 (0.56-1.33)	1.07 (0.89-1.27)	0.90 (0.73-1.10)
Genotype (TT/TC/CC)		34.1/50.1/15.8	40.1/46.3/13.6	0.13	0.56	0.51	0.45	0.31
rs2326398								
Allele (A/G)	0.54	62.3/37.7	65.5/34.5	0.87 (0.69-1.09)	0.78 (0.58-1.04)	1.12 (0.75-1.68)	1.05 (0.88-1.24)	0.91 (0.74-1.13)
Genotype (AA/AG/GG)		39.4/45.9/14.7	47.6/35.8/16.6	0.22	0.08	0.57	0.56	0.40
rs4783099								
Allele (C/T)	0.07	63.5/36.5	57.1/42.9	1.31 (1.05-1.62)	1.02 (0.78-1.32)	1.51 (1.00-2.27)	0.89 (0.75-1.07)	1.17 (0.96-1.43)
Genotype (CC/CT/TT)		38.8/49.5/11.7	31.9/50.4/17.7	0.01	0.88	0.04	0.22	0.10
rs2299043								
Allele (T/A)	0.69	70.8/29.2	73.5/26.5	0.87 (0.69-1.11)	0.98 (0.74-1.29)	0.74 (0.41-1.33)	1.04 (0.88-1.22)	0.91 (0.72-1.14)
Genotype (TT/TA/AA)		50.4/40.7/8.9	53.5/39.9/6.6	0.27	0.89	0.32	0.66	0.41
rs2237138								
Allele (A/G)	0.81	72.7/27.3	76.0/24.0	0.84 (0.66-1.08)	0.96 (0.72-1.27)	0.67 (0.34-1.31)	1.04 (0.88-1.23)	0.88 (0.69-1.12)
Genotype (AA/AG/GG)		52.8/40.0/7.2	56.8/38.3/4.9	0.17	0.77	0.24	0.59	0.29
rs2076056								
Allele (C/G)	0.75	73.8/26.2	76.1/23.9	0.88 (0.69-1.13)	0.99 (0.75-1.33)	0.68 (0.35-1.34)	1.03 (0.88-1.21)	0.91 (0.72-1.16)
Genotype (CC/CG/GG)		54.7/38.2/7.1	57.1/38.0/4.9	0.33	0.98	0.27	0.71	0.45

As the proportion of African genomic ancestry of the Brazilian population affects the genetic susceptibility to nonsyndromic oral clefts (22, 23), and previous studies have mainly associated *CRISPLD2* and *JARID2* with nonsyndromic oral cleft risk in Caucasians (4, 5, 14-16), we performed similar analyses in the subgroups of samples showing high European ancestry and high African ancestry. In the subgroup with high European ancestry, the average of European ancestry ranged from 86.4% to 93.1% (Supplementary Table 1), and the subgroup with high African ancestry showed an average African ancestry of 44.2% in the control group, 48.9% in NSCL±P and 45.8% in the NSCPO group (Supplementary Table 2). In the subgroup with high European ancestry, the *CRISPLD2* rs8061351 in homozygosis showed OR 1.41 (95% CI 1.00-1.99) and p-value 0.04, which did not withstand Bonferroni correction for multiple tests (Supplementary Table 3). Similarly, the frequency of the *JARID2* rs2237138 G allele was significantly higher in the control group versus the NSCL±P group (28.6% vs. 24.2%, p=0.03), with the OR 0.80 (95% CI: 0.64-0.98). The allele and genotype frequencies were not associated with an increased risk of nonsyndromic oral clefts in the subgroups with high African ancestry (Supplementary Table 4).

Haplotype analysis was performed to investigate whether the haplotypes in the genes were associated with nonsyndromic oral clefts (Supplementary Fig. 1 and Table 5). Our data revealed that *JARID2* SNPs were in complete linkage disequilibrium (rs2299043 and rs2237138: $D'=0.94$ and $r^2=0.80$, rs2299043 and rs2076056: $D'=0.91$ and $r^2=0.74$, rs2237138 and rs207656: $D'=0.86$ and $r^2=0.74$) (Supplementary Fig. 1A). The highest frequencies of haplotypes in all groups were C-A-G and T-G-C, whereas other haplotypes were found in less than 3%. The frequencies of haplotypes were quite similar among groups. No linkage disequilibrium was found between *CRISPLD2* SNPs (Supplementary Fig. 1B), and no further analysis was performed.

Since the effects of the selected SNPs are unclear and contradictory to previous findings, we performed power analysis assuming our current sample and different effect sizes varying the OR from 1.0 to 2.0 (Supplementary Fig. 2). This predictive analysis revealed a good statistical power to detect association at $OR \geq 1.3$ for NSCL±P, whereas with the current NSCPO sample size, a power of 80% is found in effects ≥ 1.4 .

Supplementary Table 1. Ancestral distribution of patients with high European origin.

	European	African	Amerindian
Control (n=531)	91.3%	7.2%	1.5%
NSCL±P (n=401)	93.1%	5.1%	1.8%
NSCPO (n=141)	86.4%	12.1%	1.5%

Supplementary Table 2. Ancestral distribution of patients with high African origin.

	European	African	Amerindian
Control (n=162)	53.4%	44.2%	2.4%
NSCL±P (n=148)	49.4%	48.9%	1.7%
NSCPO (n=95)	51.3%	45.8%	2.9%

Supplementary Table 3. Association of the single-nucleotide polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL±P) and nonsyndromic cleft palate only (NSCPO) in the group with high European ancestry.

	HWE	Control Group	NSCL±P Group	OR _{allele} (95% CI)	OR _{Het} (95% CI)	OR _{Hom} (95% CI)	NSCPO Group	OR _{allele} (95% CI)	OR _{Het} (95% CI)	OR _{Hom} (95% CI)
	p value	(%)	(%)	p value	p value	p value	(%)	p value	p value	p value
rs1546124										
Alelo (A/G)	0.95	66.7/33.3	66.2/33.8	1.02 (0.84-1.24)	0.94 (0.74-1.19)	1.16 (0.78-1.73)	70.1/29.9	0.89 (0.67-1.20)	0.93 (0.64-1.34)	0.84 (0.43-1.65)
Genótipo (AA/AG/GG)		44.5/44.3/11.2	45.4/41.6/13.0	0.82	0.60	0.44	49.6/41.0/9.4	0.47	0.68	0.61
rs8061351										
Alelo (T/C)	0.39	61.4/38.6	59.8/40.2	1.07 (0.89-1.29)	0.83 (0.66-1.05)	1.41 (1.00-1.99)	63.1/36.9	0.96 (0.73-1.26)	0.97 (0.68-1.38)	0.93 (0.51-1.68)
Genótipo (TT/TC/CC)		36.9/49.1/14.0	39.2/41.0/19.8	0.46	0.13	0.04	39.2/47.8/13.0	0.76	0.88	0.81
rs2326398										
Alelo (A/G)	0.69	62.4/37.6	63.5/36.5	0.95 (0.79-1.15)	0.95 (0.75-1.20)	0.99 (0.69-1.43)	64.1/35.9	0.95 (0.72-1.25)	0.93 (0.64-1.33)	0.99 (0.57-1.75)
Genótipo (AA/AG/GG)		39.3/46.1/14.6	41.5/44.0/14.5	0.62	0.69	0.98	42.7/42.7/14.6	0.74	0.68	0.99
rs4783099										
Alelo (C/T)	0.07	63.4/36.6	64.2/35.8	0.97 (0.80-1.17)	0.98 (0.78-1.23)	0.98 (0.65-1.47)	59.6/40.4	1.10 (0.84-1.44)	1.05 (0.74-1.48)	1.22 (0.68-2.18)
Genótipo (CC/CT/TT)		38.4/50.1/11.5	39.6/49.1/11.3	0.74	0.86	0.91	33.3/52.6/14.1	0.47	0.78	0.51
rs2299043										
Alelo (T/A)	0.74	69.4/30.6	72.8/27.2	0.85 (0.69-1.04)	0.95 (0.75-1.21)	0.75 (0.47-1.21)	72.6/27.4	0.89 (0.66-1.21)	0.85 (0.58-1.26)	0.99 (0.50-1.96)
Genótipo (TT/TA/AA)		48.5/41.9/9.6	52.9/39.8/7.3	0.11	0.69	0.24	54.8/35.7/9.5	0.48	0.42	0.98
rs2237138										
Alelo (A/G)	0.80	71.4/28.6	75.8/24.2	0.80 (0.64-0.98)	0.89 (0.70-1.15)	0.70 (0.41-1.20)	74.3/25.7	0.89 (0.65-1.23)	0.90 (0.62-1.33)	0.87 (0.39-1.91)
Genótipo (AA/AG/GG)		50.8/41.3/7.9	57.2/37.2/5.6	0.03	0.40	0.19	55.6/37.4/7.0	0.49	0.61	0.73
rs2076056										
Alelo (C/G)	0.74	72.7/27.3	75.0/25.0	0.89 (0.72-1.09)	1.01 (0.79-1.29)	0.68 (0.39-1.17)	74.6/25.4	0.93 (0.68-1.27)	0.86 (0.58-1.28)	1.11 (0.54-2.28)
Genótipo (CC/CG/GG)		53.1/39.1/7.8	55.3/39.4/5.3	0.26	0.94	0.16	57.8/33.6/8.6	0.65	0.45	0.77

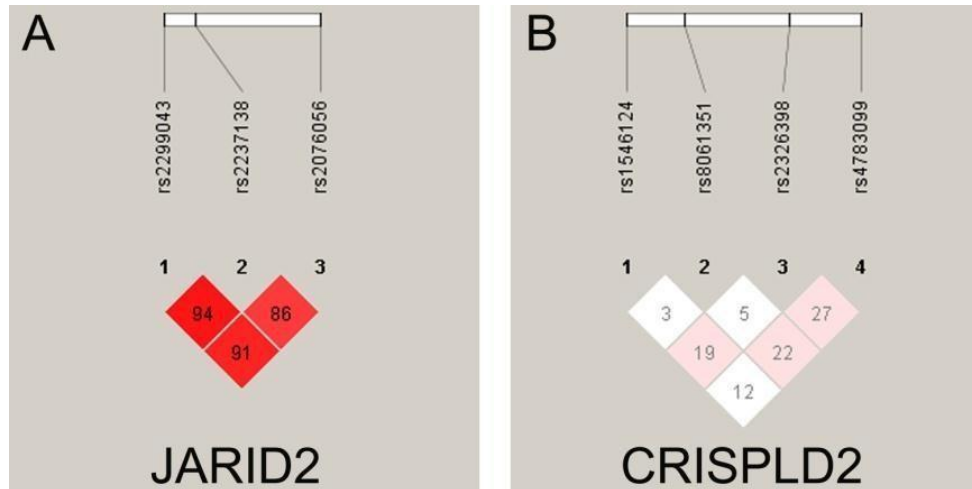
Supplementary Table 4. Association of the single-nucleotide polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL±P) and nonsyndromic cleft palate only (NSCPO) in the group with high African ancestry.

	HWE	Control Group	NSCL±P Group	OR _{allele} (95% CI)	OR _{Het} (95% CI)	OR _{Hom} (95% CI)	NSCPO Group	OR _{allele} (95% CI)	OR _{Het} (95% CI)	OR _{Hom} (95% CI)
	p value	(%)	(%)	p value	p value	p value	(%)	p value	p value	p value
rs1546124										
Allele (A/G)	0.31	71.3/28.7	70.6/29.4	1.03 (0.73-1.46)	0.99 (0.64-1.51)	1.10 (0.53-2.27)	73.0/27.0	0.94 (0.65-1.35)	1.01 (0.64-1.60)	0.80 (0.34-1.89)
Genotype (AA/AG/GG)		52.5/37.6/9.9	52.0/37.2/10.8	0.85	0.95	0.81	54.0/38.0/8.0	0.74	0.96	0.62
rs8061351										
Allele (T/C)	0.42	51.9/48.1	51.4/48.6	1.02 (0.74-1.40)	0.88 (0.60-1.30)	1.16 (0.69-1.95)	63.4/36.6	0.76 (0.55-1.04)	0.84 (0.55-1.28)	0.66 (0.34-1.25)
Genotype (TT/TC/CC)		25.3/53.1/21.6	27.9/46.9/25.2	0.90	0.53	0.56	41.1/44.6/14.3	0.08	0.42	0.20
rs2326398										
Allele (A/G)	0.58	62.0/38.0	64.5/35.5	0.89 (0.65-1.24)	0.97 (0.65-1.46)	0.87 (0.47-1.64)	67.0/33.0	0.87 (0.62-1.22)	0.63 (0.39-1.02)	1.21 (0.64-2.27)
Genotype (AA/AG/GG)		39.5/45.1/15.4	42.6/43.9/13.5	0.52	0.90	0.68	52.7/28.6/18.7	0.41	0.06	0.54
rs4783099										
Allele (C/T)	0.70	63.9/36.1	65.2/34.8	0.94 (0.68-1.31)	1.07 (0.72-1.57)	0.77 (0.37-1.57)	54.5/45.5	1.26 (0.92-1.73)	1.01 (0.66-1.55)	1.73 (0.91-3.29)
Genotype (CC/CT/TT)		40.1/47.5/12.4	39.6/49.1/11.3	0.73	0.75	0.47	30.4/48.2/21.4	0.15	0.94	0.08
rs2299043										
Allele (T/A)	0.96	75.3/24.7	73.0/27.0	1.13 (0.79-1.62)	1.28 (0.85-1.93)	0.55 (0.18-1.64)	74.3/25.7	1.04 (0.71-1.52)	1.28 (0.76-2.17)	0.74 (0.53-5.70)
Genotype (TT/TA/AA)		56.8/37.0/6.2	49.3/47.3/3.4	0.51	0.24	0.27	52.2/44.2/3.6	0.84	0.34	0.35
rs2237138										
Allele (A/G)	0.84	77.2/22.8	79.6/20.4	0.87 (0.59-1.27)	1.06 (0.69-1.63)	0.27 (0.06-1.32)	77.7/22.3	0.97 (0.66-1.45)	1.09 (0.69-1.74)	0.54 (0.14-2.09)
Genotype (AA/AG/GG)		59.3/35.8/4.9	60.5/38.1/1.4	0.46	0.78	0.08	58.0/39.3/2.7	0.91	0.69	0.36
rs2076056										
Allele (C/G)	0.92	77.5/22.5	75.5/24.5	1.11 (0.77-1.62)	1.20 (0.78-1.83)	0.69 (0.22-2.15)	77.7/22.3	0.98 (0.66-1.47)	1.21 (0.77-1.92)	0.18 (0.02-1.49)
Genotype (CC/CG/GG)		59.9/35.2/4.9	54.4/42.2/3.4	0.57	0.40	0.52	56.4/42.7/0.9	0.95	0.40	0.07

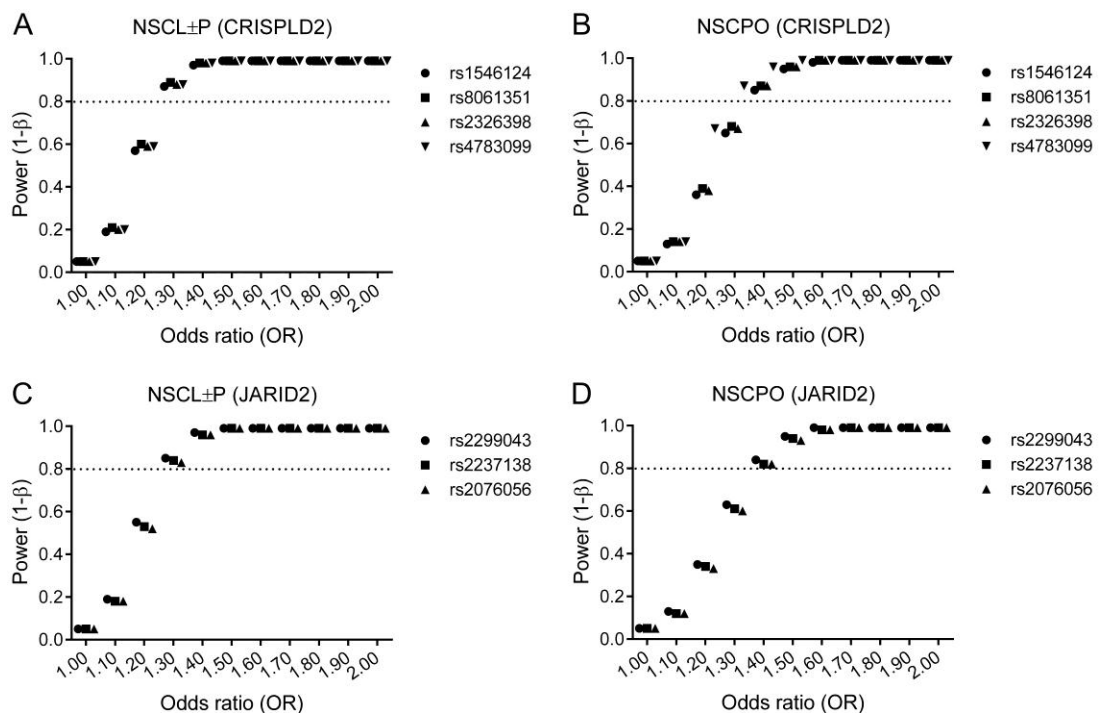
Table 5. Distribution of *JARID2* risk haplotypes.

Haplotype*	Control Group	NSCL±P Group	OR (95%CI) p value	NSCPO	OR (95%CI) p value
C-A-G	69.1%	70.9%	Reference	70.8%	Reference
T-G-C	23.9%	21.0%	1.17 (0.89-1.54) 0.25	21.2%	1.16 (0.81-1.66) 0.43
T-G-G	2.6%	1.6%	1.62 (0.72-3.65) 0.23	1.7%	1.57 (0.52-4.70) 0.42
T-A-G	1.6%	2.7%	0.59 (0.27-1.31) 0.19	3.8%	0.42 (0.17-1.05) 0.05
T-A-C	1.3%	2.2%	0.61 (0.25-1.46) 0.26	0.8%	1.57 (0.33-7.34) 0.56
C-A-C	1.5%	1.6%	0.90 (0.36-2.24) 0.82	1.7%	0.87 (0.27-2.82) 0.82

*Sequence: rs2299043, rs2237138 and rs2076056.



Supplementary Figure 1. Linkage disequilibrium plots with the SNPs within *JARID2* (A) and *CRISPLD2* (B). The plots were generated using the HaploView software. The numbers in the squares indicate the percentage linkage disequilibrium between a given pair of polymorphisms (D' value). Only for *JARID2* a clear block formed by rs2299043, rs2237138 and rs2076056 polymorphisms was identified.



Supplementary Figure 2. Statistical power of the study. If odds of NSCL±P is ≥ 1.3 and of NSCPO is ≥ 1.4 , assuming the current sample, the statistical power of 80% is

reached. Curves for *CRISPLD2* SNPs related to NSCL±P (A) and NSCPO (B), and for *JARID2* regarding NSCL±P (C) and NSCPO (D).

Discussion

In this case-control study with a structured Brazilian population, we investigated the association between polymorphic variants in *CRISPLD2* and *JARID2* and susceptibility to nonsyndromic oral clefts. We found that the presence of the T allele of *CRISPLD2* rs4783099 increased the risk for NSCPO, and rs2237138 in *JARID2* was associated with a decreased risk for NSCL±P. In the subgroup of patients with high European ancestry, *CRISPLD2* rs8061351 CC genotype was associated with risk for NSCL±P and *JARID2* rs2237168 G allele was associated with decreased risk for NSCL±P. In the subgroup of patients with high African ancestry (average higher than 40%), no significant associations were observed, though the reduction in the number of samples drove a decreased statistical power. While no linkage disequilibrium was found between *CRISPLD2* SNPs in our dataset, linkage disequilibrium between *JARID2* markers was strong, however no differences in the haplotype frequencies between control and oral cleft groups were observed. The *JARID2* rs6915344 SNP did not respect the Hardy-Weinberg equilibrium, and was excluded of analysis. Under Hardy-Weinberg assumptions, allele and genotype frequencies can be estimated from one generation to the next, and departure from this equilibrium can be indicative of potential genotyping errors or population stratification.

Based on a study revealing that *CRISPLD2* is expressed in the craniofacial region during critical time points of palatal fusion and that genetic variations could predispose orofacial clefting development (4), several association and linkage studies have been undertaken to verify the potential association between *CRISPLD2* and NSCL/P susceptibility (13-17, 19). However, discordant results are reported depending on ethnicity of the population. One of these previous studies included 328 samples from Brazilian patients with nonsyndromic oral clefts (4 cleft lip only and 324 cleft lip and palate). Although none of the studied polymorphisms withstood Bonferroni-adjustment for multiple comparisons, the SNPs rs1546124 and rs8061351 were nominally significant at p value <0.05 (16). The study also revealed no

association between nonsyndromic oral clefts and rs4783099. The SNP rs4783099 is located in the 3'-UTR region of the *CRISPLD2* gene. The haplotype between rs1546124 and rs4783099 was significantly associated with the risk of NSCL±P in the Caucasian population from USA but not in the Columbian population (4). A study with a NSCL/P population from Northwestern China revealed that the T allele of rs4783099 is associated with a decreased risk for NSCPO (17), whereas in a Han Chinese population, the rs4783099 T allele was associated with increased odds of NSCL±P and NSCLO (13). Nevertheless, some studies failed to demonstrate significant associations between *CRISPLD2* rs4783099 and oral clefts (13, 14). These conflicting results could be explained by the studies focusing on different ethnicities with different genetic backgrounds, use of small sample sizes, inadequate adjustment for confounding factors, mainly environmental variations, or differences in gene-gene and gene-environmental interactions. Indeed, Chiquet et al. (32) demonstrated that *CRISPLD2* may play important roles in nonsyndromic oral clefts through interactions with *CRISPLD1* and genes involved in folate metabolism.

Although the functional roles of *JARID2* remain unknown, high expression levels of *JARID2* were reported in the epithelial cells at the medial edge of the palatal shelves, which disappear immediately after fusion (5). Furthermore, *JARID2* interacts with polycomb-repressive complex 2 (PRC2), regulating selective DNA binding of many genes associated with nonsyndromic oral cleft, and negative histone methylation activity (10, 33). In a family-based study with 218 Italian families, several SNPs and haplotypes were significantly over or undertransmitted to patients with NSCL±P, including rs6915344, rs2299043, rs2237138 and rs2076056 (5). A replication study with a Chinese population did not confirm the association of nonsyndromic oral clefts and those *JARID2* SNPs as single-markers or haplotypes (18). The rs2237138 SNP, an intronic variant, showed the only significant association with NSCL±P in the present study. Possible explanations for this discrepancy reside on size of the sample, gene with very modest or no effect on oral cleft risk in different population or that distinct populations may have different risk alleles.

Although our study possesses statistical power, has high geographic coverage by including 4 different Centers in 4 Brazilian states and assesses the ancestry contribution of each patient, correcting for specific effects that the population stratification may have, some limitations should be mentioned. The subgroup

analysis clearly reduced the power, and an analysis of cleft subtype-specific significant variants in the patients with cleft lip only or cleft lip and palate was not performed due to the relatively small sample size of our participants. Second, we investigated individual SNPs and haplotypes without considering an interaction between them and environmental factors, especially folate undertaken during the first trimester of gestation. Finally, patients with oral clefts were recruited in four reference Centers for orofacial cleft treatment, whereas healthy controls were obtained from patients admitted into the associated Dental Schools for regular dental treatment, so selection bias may not have been avoided.

In conclusion, our results suggest that the SNP rs4783099 in *CRISPLD2* may contribute to an increased risk of NSCPO, and the SNP rs2237138 in *JARID2* may hold a protective effect against NSCL±P development in the Brazilian population. However, larger studies are required to validate our findings, and gene-gene and gene-environment interactions should be considered in future investigations.

Acknowledgments

This work was supported by grants from The National Council for Scientific and Technological Development-CNPq, and Procad/Casadinho-CNPq/CAPES, Brasília, Brazil.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 2011; **12**:167-78.
2. 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**:314-7.

3. Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res* 2009; **23**: 38-42.
4. Chiquet BT, Lidral AC, Stal S, et al. CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene. *Hum Mol Genet* 2007; **16**: 2241-8.
5. Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, et al. Expression and association data strongly support JARID2 involvement in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat* 2010; **31**: 794-800.
6. Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins-roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev* 2008; **29**:865-97.
7. Yuan Q, Chiquet BT, Devault L, et al. Craniofacial abnormalities result from knock down of nonsyndromic clefting gene, *crispld2*, in zebrafish. *Genesis* 2012; **50**: 871-81.
8. Swindell EC, Yuan Q, Maili LE, Tandon B, Wagner DS, Hecht JT. *Crispld2* is required for neural crest cell migration and cell viability during zebrafish craniofacial development. *Genesis* 2015; **53**:660-7.
9. Berge-Lefranc JL, Jay P, Massacrier A, et al. Characterization of the human jumonji gene. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 1637-41.
10. Pasini D, Cloos PA, Walfridsson J, et al. JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature* 2010; **464**: 306-10.
11. Jung J, Mysliwiec MR, Lee Y. Roles of JUMONJI in mouse embryonic development. *Dev Dyn* 2005; **232**: 21-32.
12. Park JW, Cai J, McIntosh I, et al. High throughput SNP and expression analyses of candidate genes for non-syndromic oral clefts. *J Med Genet* 2006; **43**: 598-608.
13. Shi J, Jiao X, Song T, Zhang B, Qin C, Cao F. CRISPLD2 polymorphisms are associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in a northern Chinese population. *Eur J Oral Sci* 2010; **118**: 430-3.
14. Carter TC, Molloy AM, Pangilinan F, et al. Testing reported associations of genetic risk factors for oral clefts in a large Irish study population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010; **88**: 84-93.

15. Girardi A, Martinelli M, Carinci F, Morselli PG, Caramelli E, Scapoli L. No evidence for a role of CRISPLD2 in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in an Italian population. *Eur J Oral Sci* 2011; **119**:102-5.
16. Letra A, Menezes R, Cooper ME, et al. CRISPLD2 variants including a C471T silent mutation may contribute to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Cleft Palate Craniofac J* 2011; **48**:363-70.
17. Shen X, Liu RM, Yang L, et al. The CRISPLD2 gene is involved in cleft lip and/or cleft palate in a Chinese population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011; **91**: 918-24.
18. Hao Y, Mi N, Jiao X, et al. Association of JARID2 polymorphisms with non-syndromic orofacial clefts in northern Chinese Han population. *J Oral Pathol Med* 2015; **44**: 386-91.
19. Mijiti A, Ling W, Maimaiti A, Tuerdi M, Tuerxun J, Moming A. Preliminary evidence of an interaction between the CRISPLD2 gene and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (nsCL/P) in Xinjiang Uyghur population, China. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2015; **79**: 94-100.
20. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011; **6**: e17063.
21. Bagordakis E, Paranaiba LM, Brito LA, 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 A* 2013; **161A**: 1177-80.
22. De Aquino SN, Messetti AC, Hoshi R, et al. Analysis of susceptibility polymorphisms for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2014; **100**:36-42.
23. Do Rego Borges A, Sa J, Hoshi R, et al. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Brazilian population with high African ancestry. *Am J Med Genet A* 2015; **167A**:2344-9.
24. Paranaiba LM, Bufalino A, Martelli-Junior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD. 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.

25. Brito LA, Bassi CF, Masotti C, et al. IRF6 is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population. *Am J Med Genet A* 2012b; **158A**:2170-5.
26. Brito LA, Paranaíba LMR, Bassi CFS, et al. Region 8q24 is a susceptibility locus for nonsyndromic oral clefting in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012a; **94**: 464-8.
27. Letra A, Fakhouri W, Fonseca RF, et al. Interaction between IRF6 and TGFA genes contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *PLoS One* 2012; **7**: e45441.
28. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J* 2007; **18**: 148-52.
29. Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SD. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet* 2006; **70**: 658-65.
30. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000a; **155**:945-59.
31. Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet* 2000b; **67**:170-81.
32. Chiquet BT, Henry R, Burt A, et al. Nonsyndromic cleft lip and palate: CRISPLD genes and the folate gene pathway connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011; **91**: 44-9.
33. Peng JC, Valouev A, Swigut T, et al. Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* 2009; **139**: 1290-302.

3 DISCUSSÃO

Neste espaço, dentro de um cenário de considerações finais, reforçamos os principais achados do estudo, confrontamos com os dados existentes na literatura e destacamos as perspectivas futuras para o estudo das FL/PNS.

As FL/PNS estão entre os defeitos congênitos mais comuns e representam um problema de saúde pública complexo e oneroso. Apesar do ônus econômico, o paciente deve ser submetido a um prolongado processo de reabilitação, geralmente multidisciplinar, envolvendo diversas áreas como odontologia, fonoaudiologia, medicina e psicologia (Marazita *et al.*, 2012, Murray, 2012). Além de corrigir ou minimizar as alterações relacionadas ao comprometimento estético, a fala e a posição dos dentes (Mossey *et al.*, 2009), o tratamento visa a minimização da estigmatização de seus portadores (Wehby & Cassell, 2010).

Embora com uma incidência significativa, os mecanismos relacionados à patogênese das FL/PNS permanecem parcialmente conhecidos. Neste contexto, alguns estudos têm atribuído sua ocorrência a interação de fatores genéticos e ambientais atuando sobre o embrião geneticamente predisposto (Scheller *et al.*, 2016). Em nosso estudo, essa associação não foi possível, uma vez que os fatores de risco ambiental não foram nosso objetivo, além disso, não foram avaliados os pais dos pacientes afetados, pois realizamos análise caso-controle o que dispensa esta análise.

Estudos recentes com abordagens diferenciadas têm sido realizados com o objetivo de identificar os genes envolvidos com a etiologia das FL/PNS. As abordagens mais recentes são baseadas em estudos de associação de larga escala genômica (GWAS), no qual polimorfismos distribuídos pelo genoma são analisados simultaneamente em pacientes afetados ou não pelas FL/PNS. Estes estudos identificaram a maior parte dos genes e regiões cromossômicas associadas à etiologia das FL/PNS conhecidas até o momento, como o *IRF6* e em uma região intergênica na região 8q24 (Mostowska *et al.*, 2010; Rojas-Martinez *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2012), ambos reproduzidos em diferentes populações, mas não identificaram os genes *JARID2* e *CRISPLD2* como genes candidatos à associação com desenvolvimento das FL/PNS. Limitações associadas ao reduzido tamanho da amostra ou a presença de diferentes genes de susceptibilidade em diferentes

amostras, além dos critérios de exclusão na técnica de GWAS, podem justificar estes resultados. Embora o GWAS seja capaz de caracterizar milhares de polimorfismos em todo o genoma, não se pode desconsiderar limitações associadas a esta técnica como a identificação de falsos-positivos. Também pode haver a perda do sinal das variantes de risco verdadeiros junto ao ruído estatístico, a partir do grande número de marcadores que não são associados com a doença. Para separar sinais de ruídos verdadeiros, os pesquisadores precisam definir além de um limite alto, marcadores precisos, antes de aceitá-lo como um candidato causal da doença. Este limiar elevado reduz o problema de falsos-positivos, mas também pode ocasionar a perda de marcadores verdadeiros de doença com pequeno efeito junto ao ruído de fundo. Por exemplo, cerca de 2% das fissuras orais são atribuídas a defeitos no gene *MSX1*, mas, até agora, nenhum GWAS em FL/PNS identificou polimorfismos neste gene como possíveis marcadores de suscetibilidade. Assim, os resultados negativos em um GWAS (assim como positivos) não devem excluir um gene ou locus.

Em função de sua importância genética na embriogênese, os polimorfismos em genes relacionados ao desenvolvimento craniofacial tornam-se candidatos naturais para o desenvolvimento de FL/PNS. Os polimorfismos bem como suas correlações com as FL/PNS variam amplamente entre as diferentes populações, fazendo com que estudos de validação de suscetibilidade e associação de polimorfismos genéticos sejam essenciais para aumentar a compreensão da complexidade desta anomalia de origem multifatorial (Paranaíba *et al.*, 2013; Aquino *et al.*, 2014b). Neste contexto, torna-se interessante avaliar o papel dos *JARID2* e *CRISPLD2* que representam alvos promissores apesar de pouco explorados (Scapolli *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2015; Chiquet *et al.*, 2007; Letra *et al.* 2011; Girardi *et al.*, 2011). O gene *JARID* está associado com o desenvolvimento do palato (Takahashi *et al.*, 2004), além de apresentar-se altamente expresso em diferentes estruturas craniofaciais envolvidas no desenvolvimento do lábio e palato em embriões humanos (Park *et al.*, 2006). Chiquet e colaboradores (2007) relataram o envolvimento do locus 16q.24, no qual *CRISPLD2* está localizado, na etiologia das FL/PNS. Neste estudo incluindo populações caucasianas e hispânicas, os autores revelaram que *CRISPLD2* é expresso na região craniofacial durante a fusão do palato e, que variações genéticas poderiam predispor ao desenvolvimento de

fissuras orais não-sindrômicas (Chiquet *et al.*, 2007). No entanto, além de apresentarem resultados conflitantes, estes estudos abordaram grupos populacionais heterogêneos ou então não consideraram o tamanho da amostra analisada (Chiquet *et al.*, 2007; Letra *et al.*, 2011). Assim sendo, estes estudos nos motivaram a busca pelo esclarecimento do papel dos genes *JARID2* e *CRISPDL2* e os polimorfismos como possíveis marcadores para FL/PNS. Em concordância com nossos resultados, recentes estudos realizados entre polimorfismos comuns entre grupos de pacientes afetados e controle, também identificaram uma fraca associação entre *JARID2* e *CRISPDL2* como genes candidatos à associação com desenvolvimento das FL/PNS (Chiquet *et al.*, 2007; Mijiti *et al.*, 2015; Hao *et al.*, 2015). Da mesma forma, como em nosso estudo, limitações associadas ao reduzido tamanho da amostra além e diferenças nos critérios de exclusão adotados podem justificar estes resultados.

Diferentemente dos estudos supracitados que avaliaram a associação dos genes *JARID2* e *CRISPDL2* com a ocorrência de FL/PNS, nós realizamos esta análise pela primeira vez na população brasileira. Por diversas razões, o Brasil fornece um cenário único para este tipo de estudo. Além de ser o maior país na América do Sul, o país é constituído por uma das populações mais diversificadas em termos de ancestralidade, tornando-se particularmente adequado para estudos genéticos com base em mapeamento por miscigenação, que afeta a suscetibilidade genética para fissuras orais não-sindrômicas (Pena *et al.*, 2011; Bagordakis *et al.*, 2013; de Aquino *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2015). Adicionalmente, com a finalidade de evitar possível estratificação populacional da amostra, coletamos amostras de indivíduos provenientes de diferentes regiões do país, sem deixar de levar em consideração a variabilidade da ancestralidade de cada indivíduo avaliado.

Em nosso estudo, a prevalência europeia seguida da africana e ameríndia foi obtida tanto no grupo caso quanto no grupo controle, confirmando outros estudos realizados em populações brasileiras (Pena *et al.*, 2011; Filezio *et al.*, 2013; Aquino *et al.*, 2014b). Por outro lado, a ausência de fortes associações entre os polimorfismos gênicos e a ocorrência de FL/PNS pode decorrer justamente desta intensa miscigenação étnica da população, além do número de indivíduos avaliados. O número limitado de amostras também inviabilizou as análises relativas aos polimorfismos e os subtipos de fissuras FLNS e FPNS. Além disso, não podemos

desconsiderar o fato de que indivíduos portadores de fissuras em tratamento e acompanhamento em centros especializados foram comparados a uma população controle composta por indivíduos saudáveis. Um dos vieses de seleção deste e de outros estudos sobre fissuras orais geralmente decorre do fato de que as informações sobre as anomalias geralmente são oriundas de bancos de dados pertencentes a instituições de saúde, universidades, hospitais ou clínicas, onde nem sempre é feito um registro de informações adequado. Desta maneira, ressaltamos a necessidade da realização da otimização dos sistemas de coleta de dados e da adequada triagem genética familiar dos indivíduos portadores desta malformação.

Dessa forma, podemos concluir que os resultados do presente estudo sugerem uma correlação entre o polimorfismo rs4783099 no gene *CRISPD2* e do polimorfismo rs2237138 no gene *JARID2* com desenvolvimento de FL/PNS na população brasileira. Estes achados nos permite especular que a utilização de amostras mais robustas, técnicas diferentes e interações gene-gene ou gene-ambiente devem ser explorados em investigações futuras com o intuito de comprovarem-se estas correlações. A comprovação destes resultados proporcionará a ampliação da compreensão e conhecimento acerca dos eventos genéticos responsáveis pelo desenvolvimento de FL/PNS e talvez, permita até a otimização de medidas preventivas.

4 CONCLUSÕES

- 1- O alelo T e o genótipo TT do polimorfismo rs4783099 no gene *CRISPLD2* revelaram uma tendência de associação com um risco aumentado para o desenvolvimento de FPNS.
- 2- As frequências do alelo G e do genótipo em homozigose (GG) do polimorfismo rs2237138 no gene *JARID2* sugerem uma tendência de associação com FL±PNS.
- 3- Embora os polimorfismos rs2299043, rs2237138 e rs2076056 no gene *JARID2* apresentem completo desequilíbrio de ligação, formando um bloco de haplótipo, não houve diferença nas distribuições entre os grupos.
- 4- A análise no subgrupo de indivíduos com elevada ancestralidade Africana não revelou uma associação significativa.

REFERÊNCIAS¹

- Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J.* 2007; 18:148-152.
- Ahsan M, Ohta K, Kuriyama S, Tanaka H. Novel soluble molecule, Akhirin, is expressed in the embryonic chick eyes and exhibits heterophilic cell-adhesion activity. *Dev Dyn.* 2005 May; 233(1):95-104.
- Aguilar B, Rojas JC, Collados MT. Metabolism of homocysteine and its relationship with cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2004 Oct; 18(2):75-87.
- Bagordakis E, Paranaiba LM, Brito LA, de Aquino SN, Messetti 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 A.* 2013 May; 161a(5):1177-80.
- 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 5):658-65.
- Berge-LeFranc JL, Jay P, Massacrier A, Cau P, Mattei MG, Bauer S, et al. Characterization of the human jumonji gene. *Hum Mol Genet.* 1996 Oct; 5(10):1637-41.
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, et al. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2009; 41:473-7.
- Boyles AL, Billups AV, Deak KL, Siegel DG, Mehlretter L, Slifer SH, et al. Neural tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene-environment interactions. *Environ Health Perspect.* 2006; 114(10): 1547-52.
- Brito LA, Paranaiba LMR, Bassi CFS, Masotti C, Malcher C, Schlesinger D, et al. 2012. Region 8q24 is a susceptibility locus for nonsyndromic oral clefting in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012 Jun 94(6):464-468.

¹De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed

- Brito LA, Bassi CF, Masotti C, Malcher C, Rocha KM, Schlesinger D, et al. 2012b. IRF6 is a risk factor for nonsyndromic cleft lip in the Brazilian population. *Am J Med Genet A*. 2012 Sep; 158A(9):2170-2175.
- Bufalino [A](#), [Ribeiro Paranaíba LM](#), [Nascimento de Aquino S](#), [Martelli-Júnior H](#), [Oliveira Swerts MS](#), [Coletta RD](#). 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 Nov; 88(11):980-6.
- Butali A, Suzuki S, Cooper ME, [Mansilla AM](#), [Cuenco K](#), [Leslie EJ](#), et al. Replication of genome wide association identified candidate genes confirm the role of common and rare variants in PAX7 and VAX1 in the etiology of nonsyndromic CL(P). *Am J Med Genet A*. 2013 May; 161A(5):965-72.
- Butali A, Mossey P, Adeyemo W, Eshete M, Gaines L, Braimah R, et al. Rare functional variants in genome-wide association identified candidate genes for nonsyndromic clefts in the African population. *Am J Med Genet A*. 2014 Oct; 164A(10):2567-71.
- Carter TC, Molloy AM, Pangilinan F, Troendle JF, Kirke PN, Conley MR, et al. Testing reported associations of genetic risk factors for oral clefts in a large Irish study population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010 Feb; 88(2):84-93.
- Chai Y, Maxson RE Jr. Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn*. 2006 Sep; 235(9):2353-75.
- Chiquet BT, Lidral AC, Stal S, Mulliken JB, Moreno LM, Arco-Burgos M, et al. CRISPLD2: a novel NSCLP candidate gene. *Hum Mol Genet*. 2007 September 15; 16(18): 2241-2248.
- Chiquet BT, Henry R, Burt A, Mulliken JB, Stal S, Susan Blanton SH, et al. Nonsyndromic cleft lip and palate: CRISPLD Genes and the Folate Gene Pathway Connection. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011 January; 91(1): 44-49.
- Cobourne MT. The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod*. 2004; 26(1): 7-16.
- De Aquino SN, Messetti AC, Hoshi R, Borges A, Viena CS, Reis SR, et al. Analysis of susceptibility polymorphisms for nonsyndromic cleft lip with or

- without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2014a Jan; 100(1):36-42.
- De Aquino SN, Hoshi R, Bagordakis E, Pucciarelli MG, Messetti AC, Moreira H, et al. MTHFR rs2274976 polymorphism is a risk marker for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Brazilian population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2014b Jan; 100(1):30-5.
 - De Souza LT, Kowalski TW, Ferrari J, Monlleo IL, Ribeiro EM, de Souza J, et al. Study of IRF6 and 8q24 region in non-syndromic oral clefts in the Brazilian population. *Oral Dis.* 2016 Apr;22(3):241-5.
 - Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011 Mar;12(3):167-78.
 - Do Rego Borges A, Sá J, Hoshi R, Viena CS, Mariano LC, Veiga PC, et al. Genetic Risk Factors for Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in a Brazilian Population With High African Ancestry. *Am J Med Genet A.* 2015 Oct;167A(10):2344-9.
 - Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Küchler EC, Tannure PN, Costa Mde C, Amorim LM, et al. The functional EGF+61 polymorphism and nonsyndromic oral clefts susceptibility in a Brazilian population. *J Appl Oral Sci.* 2015 Jul-Aug;23(4):390-6.
 - Filézio MR, Bagordakis E, de Aquino SN, Pereira Messetti AC, Martelli-Júnior H, Swerts MS, et al. Polymorphisms in GABRB3 and oral clefting in the Brazilian population. *DNA Cell Biol.* 2013 Mar;32(3):125-9.
 - Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins-roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev.* 2008 Dec;29(7):865-97.
 - Girardi A, Martinelli M, Carinci F, Morselli PG, Caramelli E, Scapoli L. No evidence for a role of CRISPLD2 in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in an Italian population. *Eur J Oral Sci.* 2011 Feb;119(1):102-5.
 - Grant SF, Wang K, Zhang H, Glaberson W, Annaiah K, Kim CE, et al. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *JPediatr.* 2009 Dec;155(6):909-13.

- Hao Y, Mi N, Jiao X, Zheng X, Song T, Zhuang D, et al. Association of JARID2 polymorphisms with non-syndromic orofacial clefts in northern Chinese Han population. *J Oral Pathol Med* 2015; May 44(5): 386-391.
- Jung J, Mysliwiec MR, Lee Y. Roles of JUMONJI in mouse embryonic development. *Dev Dyn*. 2005 Jan; 232(1):21-32.
- Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, et al. Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. *PLoS One*. 2009;4(4):e5385.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002 Jun;12(6):996-1006.
- Kim TG, Kraus JC, Chen J, Lee Y. JUMONJI, a critical factor for cardiac development, functions as a transcriptional repressor. *J Biol Chem*. 2003 Oct 24;278(43):42247-55.
- Kohli SS, Kohli VS. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012 Jan;16(1):64-72.
- Law AJ, Lipska BK, Weickert CS, Hyde TM, Straub RE, Hashimoto R, et al. Neuregulin1 transcripts are differentially expressed in Schizophrenia and regulated by 50 SNPs associated with the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 25;103(17):6747-52.
- Letra A, Menezes R, Cooper ME, Fonseca RF, Govil M, Granjeiro JM, et al. CRISPLD2 variants including a C471T silent mutation may contribute to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011 Jul;48(4):363-70.
- Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013 Nov;163C(4):246-58.
- Lidral AC, Moreno LM, Bullard SA. Genetic Factors and Orofacial Clefting. *Semin Orthod*. 2008 Jun;14(2):103-114.
- Liepinsh E, Trexler M, Kaikkonen A, Weigelt J, Bányai L, Patthy L, et al. NMR structure of the LCCL domain and implications for DFNA9 deafness disorder. *EMBO J*. 2001 Oct 1;20(19):5347-53.
- Machado RA, Messetti AC, de Aquino SN, Martelli-Júnior H, Swerts MS, de Almeida Reis SR, et al. Association Between Genes Involved in Craniofacial

Development and Nonsyndromic Cleft Lip and/or Palate in the Brazilian Population. *Cleft Palate Craniofac J.* 2015 Sep 24.

- Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferriani M, Herms S, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet.* 2010 Jan;42(1):24-6.
- Marazita ML. The evolution of human genetic studies of cleft lip and cleft palate. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:263-83.
- Martelli-Junior H, Bonam PRF, Santos RC, Swertz MSO, Coletta RD. An epidemiologic study of lip and palate clefts from a Brazilian reference hospital. *Quintessence Int.* 2008 Oct;39(9):749-52.
- Martelli-Junior H, Porto LV, Martelli DR, Bonam 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 Oct-Dec; 21(4):314-7.
- Meng L, Bian Z, Torensma R, Von den Hoff JW. Biological Mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J Dent Res.* 2009 Jan;88(1):22-33.
- Mills JL, Molloy AM, Parle-McDermott A, Troendle JF, Brody LC, Conley MR, et al. Folate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008 Sep; 82(9):636-43.
- Mijiti A, Ling W, Maimaiti A, Tuerdi M, Tuerxun J, Moming A. Preliminary evidence of an interaction between the CRISPLD2 gene and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (nsCL/P) in Xinjiang Uyghur population, China. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2015 Feb;79(2):94-100.
- Mitchell LE, Beaty TH, Lidral AC, Munger RG, Murray JC, Saal HM, et al. Guidelines for the design and analysis of studies on nonsyndromic cleft lip and cleft palate in humans: summary report from a Workshop of the International Consortium for Oral Clefts Genetics. *Cleft Palate Craniofac J.* 2002; 39(1):93–100.
- Mirfazeli A, Kaviany N, Hosseinpour KR, Golalipour MJ. Incidence of cleft lip and palate in gorgan - northern Iran: an epidemiological study. *Oman Med J.* 2012 Nov;27(6):461-4.

- Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicka K, Biedziak B, Jagodzinski PP. Polymorphic variants at 10q25.3 and 17q22 loci and the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012 Jan; 94(1):42-6.
- 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. 2002:127-158.
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet*. 2009; 374(9703):1773-1785.
- 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):392-9.
- Murthy J, Bhaskar LVKS. Current concepts in genetics of nonsyndromic clefts *Indian J Plast Surg*. 2009 Jan-Jun; 42(1):68-81.
- Nagai H, Sugito N, Matsubara H, Tatematsu Y, Hida T, Sekido Y, et al. CLCP1 interacts with semaphorin 4B and regulates motility of lung cancer cells. *Oncogene*. 2007 Jun 7; 26(27):4025-31.
- Olson EN. A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med*. 2004 May; 10(5):467-74.
- Paranaiba LM, Bufalino A, Martelli-Junior H, de Barros LM, Graner E, Coletta RD. Lack of association between IRF6 polymorphisms (rs2235371 and rs642961) and non-syndromic cleft lip and/or palate in a Brazilian population. *Oral Dis*. 2010 Mar; 16(2):193-7.
- Park JW, Cai J, McIntosh I, Jabs EW, Fallin MD, Ingersoll R, et al. High throughput SNP and expression analyses of candidate genes for non-syndromic oral clefts. *J Med Genet*. 2006 Jul; 43(7):598-608.
- Pasini D, Cloos PA, Walfridsson J, Olsson L, Bukowski JP, Johansen JV, et al. JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature*. 2010 Mar 11; 464(7286):306-10.
- 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.

- Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, Sidow A, et al. Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell*. 2009 Dec 24;139(7):1290-302.
- Prescott NJ, Malcolm S. Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *Cleft Palate Craniofac J*. 2002 May; 39(3):327-31.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000a Jun;155(2):945-59
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet*. 2000b Jul;67(1):170-81.
- Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J*. 2012 Jan;49(1):73-91.
- Sperber GH. Formation of the primary and secondary palate. In: Wyszynski DF, ed. *Cleft lip and palate: from origin to treatment*. New York: Oxford University Press, 2002:5–24.
- Rodrigues K, Sena MF, Roncalli AG, Ferreira MA. Prevalence of orofacial clefts and social factors in Brazil. *Braz Oral Res*. 2009 Jan-Mar;23(1):38-42.
- Rojas-Martinez A, Reutter H, Chacon-Camacho O, Leon-Cachon RB, Munoz-Jimenez SG, Nowak S, et al. 2010. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population: evidence for IRF6 and variants at 8q24 and 10q25. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010 Jul;88(7):535-7.
- Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Palmieri A, Girardi A, Savoia A, et al. Expression and Association Data Strongly Support JARID2 Involvement in nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate. *Hum Mutat*. 2010 Jul; 31(7):794-800.
- Scheller K, Kalmring F, Schubert J. Sex distribution is a factor in teratogenically induced clefts and in the anti-teratogenic effect of thiamine in mice, but not in genetically determined cleft appearance. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016 Feb;44(2):104-9.

- Shen X, Liu RM, Yang L, Wu H, Li PQ, Liang YL, et al. The CRISPLD2 gene is involved in cleft lip and/or cleft palate in a Chinese population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011 Oct;91(10):918-24.
- Shi J, Jiao X, Song T, Zhang B, Qin C, Cao F. CRISPLD2 polymorphisms are associated with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in a northern Chinese population. *Eur J Oral Sci*. 2010 Aug;118(4):430-3.
- Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classification of cleft lip and cleft palate. Suggested changes. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1972 Jan-Feb;27(1):5-6.
- Stanier P, Moore GE. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet*. 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R73-81.
- Takahashi M, Kojima M, Nakajima K, Suzuki-Migishima R, Motegi Y, Yokoyama M, et al. Cardiac abnormalities cause early lethality of jumonji mutant mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov 26;324(4):1319-23.
- Takeuchi T, Yamazaki Y, Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Kondo S, Motoyama J, et al. Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev*. 1995 May 15;9(10):1211-22.
- Trexler M, Bányai L, Patthy L. The LCCL module. *Eur J Biochem*. 2000 Sep;267(18):5751-7.
- Topping A, Harris P, Moss AL. The 6p deletion syndrome: a new orofacial clefting syndrome and its implications for antenatal screening. *Br J Plast Surg*. 2002 Jan;55(1):68-72.
- Toyoda M, Kojima M, Takeuchi T. Jumonji is a nuclear protein that participates in the negative regulation of cell growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug 2;274(2):332-6.
- Wehby GL, Cassell CH. The impact of orofacial clefts on quality of life and healthcare use and costs. *Oral Dis*. 2010 Jan;16(1):3-10.

ANEXOS

Anexo 1

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Validação de polimorfismos gênicos associados à fissura lábio-palatina não-sindrômica na população brasileira", protocolo nº 122/2010, dos pesquisadores Ricardo Della Coletta, Ana Camila Pereira Messetti, Elizabete Bagordakis Pinto, Livia Máris Ribeiro Paranaíba, Marcella Rosa Filezio e Maria Giulia Rezende Pucciarelli, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 15/11/2010, com alterações em 26/07/2011 e 14/06/2016.</p>		
<p>The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project "Validation of polymorphisms associated with non-syndromic cleft lip and palate in the brazilian population", register number 122/2010, of Ricardo Della Coletta, Ana Camila Pereira Messetti, Elizabete Bagordakis Pinto, Livia Máris Ribeiro Paranaíba, Marcella Rosa Filezio and Maria Giulia Rezende Pucciarelli, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Nov 15, 2010; with alterations on Jul 26, 2011 and Jun 14, 2016.</p>		
 Profa. Dra. Fernanda Miori Pascon Secretária CEP/FOP/UNICAMP	 Prof. Dr. Jacks Jorge Junior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP	
<small>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</small>		

Anexo 2**CERTIFICADO SUBMISSÃO DO ARTIGO**

Dear author of "Brazilian multicenter study of association between polymorphisms in CRISPD2 and JARID2 and nonsyndromic oral clefts",

The manuscript entitled "Brazilian multicenter study of association between polymorphisms in CRISPD2 and JARID2 and nonsyndromic oral clefts" (original submission or revision) has been submitted by Prof. Ricardo D. Coletta to the Journal of Oral Pathology and Medicine.

You have been listed as (co)-author for the manuscript. If this is not the case, please reply to this email.

Sincerely,
Emmanuel Ong
Administrator, Journal of Oral Pathology and Medicine