

**ETIOLOGÍA GENÉTICA DE LA FORMACIÓN DE LAS FISURAS
LABIO/PALATINAS, ESTADO DEL ARTE: REPORTE DE CASOS Y REVISIÓN
DE LA LITERATURA**

*GENETIC ETIOLOGY OF CLEFT LIP/ PALATE FORMATION,
STATE OF ART. CASE REPORT AND LITERATURA REVIEW.*

Carlos Araya Vallespir⁽¹⁾, Patricio Encalada Zamorano⁽²⁾, Jorge Vargas Ulloa⁽³⁾.

1. Departamento de Prevención y Salud Pública Odontológica, Facultad de Odontología, Universidad de Concepción, Chile
2. Unidad de Ortodoncia, Hospital Las Higueras de Talcahuano.
3. Facultad de Odontología, Universidad de Concepción. Interno Hospital Las Higueras de Talcahuano.

Correspondencia:

Jorge Vargas Ulloa

Janequeo 493, Dpto. 402 Concepción, Región del Bio Bio, Chile.

Tel: (056) 9-51145669

e-mail: jorgevargas@udec.cl

"Sin conflictos de interés"

Resumen

Las fisuras orales (F.O) son las malformaciones congénitas más frecuentes, su etiología es multifactorial, influencia de factores genéticos y ambientales y su prevalencia es variable, siendo mayor en razas asiáticas y menor en razas africanas, en Chile es de 1.8 en mil nacidos vivo y los nacimientos se concentran en las regiones Metropolitana, V y VIII. Dentro de las causas ambientales, tenemos fármacos, nicotina y alcohol, enfermedades crónicas de la madre, déficit de folatos y estrés entre otros, todos críticos durante el primer trimestre de la gestación. Se ha podido asociar una gran cantidad de locus a genes candidatos, usando diversos estudios, que incluyen GWAS (mapeo de genoma completo), análisis por ligamiento y otros, permitiendo identificar genes y asociarlos con las FO. Los genes más estudiados que presentan asociaciones positivas para fisuras son TGFB3, MSX1, VAX1, BMPs entre otros. En este trabajo se presentaran 3 casos clínicos, se analizaran cariogramas e historia clínica, con el fin de descartar la presencia de síndromes, efecto de teratógenos y componentes del medio ambiente y poder asociarlo la causa de las fisuras en estos pacientes con una causa genética.

Palabras claves: Genética, no-sindrómico, fisura labio/palatinA, etiología, polimorfismo. Genetic, non-syndromic, cleft lip/palate, etiology, polymorfism.

Summary

The oral clefts are the most common congenital malformations, the etiology is multifactorial, influenced by genetic and environmental factors and their prevalence is variable, being higher in Asian and less races in African races in Chile is 1.8 thousand live births and births are concentrated in the Metropolitan, V and VIII regions. Among the environmental causes: drugs, nicotine and alcohol, chronic diseases of the mother, folate deficiency and stress among others, all critical during the first trimester. It was possible to attach a large number of candidate gene locus using various studies including GWAS (whole genome mapping), linkage analysis, and others, allowing the identification of genes and associated with oral clefts.

The most studied genes that have positive associations for fissures are TGFB3, MSX1, Vax1, BMPs among others. In this paper we present 3 clinical cases, were analyzed cariogramas and history, in order to rule out syndromes, and teratogenic effect of components of the environment and to associate the cause of cracks in these patients with a genetic cause.

Introducción.

Las fisuras labio alveolo palatinas (FLAP) son malformaciones congénitas de mayor prevalencia a nivel mundial, afectan el área bucofacial y se producen por falla en la fusión de los tejidos del labio y paladar.¹

70% del total son no-sindrómicas, el otro 30 % se asocia con 400 síndromes aproximadamente^{2,3}, 75% de las fisuras que involucran al labio son bilaterales y de estas, las del lado izquierdo son el doble que las del lado derecho^{4,5}

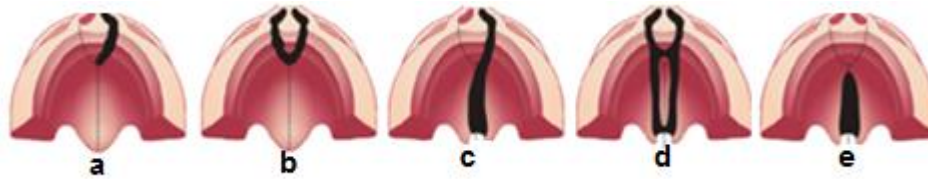
Entre las no sindrómicas, fisura labio paladar es el doble de frecuente en hombres que en mujeres.^{4,6}

Se ha evidenciado la existencia de subfenotipos como úvula bífida, microformas de labio y paladar hendido; y fenotipos subclínicos como medidas craneofaciales anormales y alteraciones dentarias de número y forma.²

Microforma de fisura o fisura cicatrizada congénitamente, paladar hendido submucoso e insuficiencia velofaríngea se pueden explicar por penetrancia incompleta o aparente falta de patrones de herencia mendeliana⁴

Se ha reportado que en padres cuyos hijos presentan fisuras orales, las medidas craneofaciales están fuera de rangos de normalidad, pudiendo ser factores de riesgo.

Los fenotipos subclínicos también pueden explicar el fenómeno de discordancia en parejas de gemelos monocigotos.²



a y b: Fisura paladar primario. **c y d:** F. paladar primario y secundario. **e:** F. paladar secundario.

La prevalencia mundial es de 1 por 1.200 nacidos vivos (NV) y varía entre razas: en asiáticos 1 en 500, africanos 1 en 2500 y caucásicos, hispánicos y latinos 1 en 1000. En Chile se concentran en las regiones Metropolitanas, V y VIII y el promedio en Chile afecta casi al doble de la tasa mundial, 1.8 por mil NV.^{1,7}

La etiología es multifactorial, genética y ambiental.

Estrés materno⁸, nicotina, alcohol, fármacos como fenitoina⁹, AINES¹⁰, deficiencias nutricionales^{5,7} y edad extrema de los progenitores aumentan riesgo de FO.¹¹

Existe un alto riesgo de recurrencia familiar; en parientes de primer grado se estima que el riesgo es de 32 veces para un individuo sin historial de FO.²

El rango de concordancia en gemelos monocigotos es de 40-60%, en comparación con gemelos dicigóticos que es de un 3-5%, lo que sugiere una fuerte pero no pura etiología genética.²

La boca primitiva comienza su desarrollo y formación entre los días 28 a 30 de gestación, por lo que se ha postulado que genes involucrados en dichos procesos son posibles candidatos en la etiología genética de las Fisura labio alveolo palatina No Sindrómico (FLAP-NS).

La migración celular desde la cresta neural hacia la región anterior de la cara da lugar a la formación de los arcos branquiales.

Entre las semanas 5 y 6, los procesos frontonasales y mandibulares se aproximan y dan forma a la boca primitiva. Luego estos procesos se fusionan con el tabique nasal medio para formar paladar y la úvula (días 50 a 60)^{12,13}.

Fallas en el crecimiento o fusión de estos procesos resulta en fisuras orofaciales que involucran al labio superior, alveolo, y/o paladar primario.

Se han identificado gran cantidad de locus asociados a genes candidatos, cuya alteración afecta procesos embrionarios críticos que estarían involucrados con fisuras orales^{3,14,15}.

REPORTE DE CASOS

Caso N°1

Dos hermanos gemelos, 1 año de edad, ambos con fisuras orales no sindrómicas. Se solicita cariógrama para descartar origen sindrómico de la FO.

Examen clínico paciente N°1

Paciente masculino, presenta Fisura unilateral de labio derecho (Imagen 1 y 2) sin afectar tejidos nasales. Al examen intraoral no se observa fisura de paladar o de procesos alveolares. No hay alteración de posición o forma de otras estructuras craneofaciales o estructuras corporales que puedan asociar la fisura con algún síndrome.

Examen clínico paciente N°2

Paciente masculino, presenta Fisura labio alveolo palatina de lado izquierdo. La fisura incluye tejidos nasales y de paladar blando y duro (Imagen 3 y 4) No hay alteración en posición o forma de otras estructuras craneofaciales. No presenta alteraciones en otras estructuras corporales que puedan asociar la FO con algún síndrome.

INFORME CARIOTIPAS: Cariotipo:**46, XY**, indica presencia de 46 cromosomas. En las 20 mitosis analizadas se encontraron 46 cromosomas, sin anomalías estructurales, descartando síndromes producidos por alteraciones en el número de cromosomas, tales como trisomías o forma cromosómica, tal como se ven en las Imágenes 5 y 6.

Entrevista a los progenitores.

Se realizó una entrevista a la madre para obtener información relevante sobre el periodo gestacional crítico del embarazo e historia familiar relevante.

- Ausencia de enfermedades sistémicas, crónicas o virales asociadas con FO al momento de la gestación: diabetes mellitus, hipertensión arterial
- Padre y madre sin FO evidentes.
- Consumo de fármacos (-):fenitoína,warfarina,corticoides.
- Consumo de alcohol y/o tabaco (-).
- Historial familiar paterno (-) y materno (+); primo afectado.
- Edad de ambos progenitores entre 25–35 años.

Caso clínico N°2

Paciente sexo femenino, 21 años, FLAP-NS unilateral izquierda al nacer (imagen 7).

Sin otras alteraciones craneofaciales o corporales que indiquen FO sindrómico.

Examen intraoral: cicatriz post-quirúrgica de paladar y alveolo izquierdo (imagen 8), anterior a cirugía correctiva, agenesia piezas 2.2, 2.4 asociadas con FO.

Entrevista a los progenitores.

- Padre con FLAP bilateral, madre sana.
- Enfermedades sistémicas, crónicas o virales (-): diabetes mellitus, hipertensión arterial.
- Consumo de fármacos(-):fenitoína,warfarina,corticoides.
- Consumo de alcohol y/o tabaco (-).
- Edad de los progenitores: madre 37, padre 42, puede considerarse edad tardía, asociación (+) FO.
- Ambiente laboral de padres sin exposición de teratógenos.

DISCUSIÓN

Las enfermedades genéticas son producto de mutaciones que ocurren por variación en la secuencia normal de un gen, debido a un cambio en el número de bases o sustitución de ellas, generando un Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP) o gen

alelo. Dichos polimorfismos se debe presentar en al menos el 1% de la población, si no se consideran mutaciones aisladas que no se transmite en la población.

La finalidad de los estudios genéticos de asociación en poblaciones es buscar la relación entre un gen, sus polimorfismos y enfermedades, utilizando SNP y Haplotipos (SNPs que se transmiten en bloque) como marcadores, identificándose una gran cantidad de locus con FO.¹⁴⁻¹⁷

Uno de estos candidatos es **MSX1** o **Msh homeobox 1**, expresado en las células de la cresta neural. Estas células migran hacia la prominencia frontonasal de los arcos branquiales para dar lugar a la mandíbula y cráneo anterior.²

Los primeros estudios se realizaron en ratones transgénicos deficientes de MSX1. Estos mostraron múltiples defectos craneofaciales, incluyendo fisura de paladar secundario, anomalías de varios huesos de la cara y agenesia dentaria.¹⁸

Estas observaciones establecieron a MSX1 como un gen candidato tanto para paladar hendido y agenesia dentaria en humanos.

La primera mutación identificada en humanos se encontro en una familia con agenesia dental sin FO. Estudios posteriores en familias holandesas con agenesia y varias combinaciones de FL/P o FP encontraron mutaciones sin sentido en el exón 1 de MSX1, las que segregan de manera autosómica dominante para fisura y agenesia, lo que sugiere que en casos familiares pueden identificarse mutaciones en MSX1.^{9,19}

Se ha sugerido que la mayoría de las mutaciones del gen MSX1 en el homeodominio causan agenesia dentaria, y las mutaciones fuera de este están asociadas con FL/P.¹⁹

Se han reportaron 78 SNP conocidos dentro o cerca de este gen y se ha podido asociar mutaciones de MSX1 en aproximadamente un 2% de los casos de FO.¹⁹

Diferentes estudios realizados en todo Sudamérica, han encontrado asociación entre diferentes alelos polimórficos de MSX1y FL/P.

En Brasil por ejemplo, se observó una sobre transmisión de un alelo de MSX1 con 169 pares de bases en el total de FL/P y se encontró que FL/P se dio con más

frecuencia en hombres 56% y FP más frecuente en mujeres (73%), indicio de una posible predilección por sexo de las variantes de FO, FL/P.

En Chile un estudio analizó 5 SNPs de MSX1 en pacientes con FO-NS y encontró que 4 Haplotipos mostraron sobretransmisión, no así los SNP por separado. Esto no permite asociar a los SNP por separado, pero sí indica que los Haplotipos serían factores de riesgo para FO-No Síndromico.³

En Estonia, se estudió 176 SNP marcados previamente en 18 genes candidatos, encontrándose asociación significativa con un SNP para el gen msx1, por lo que este sería un factor de riesgo²⁰. También se ha podido asociar SNP de msx1 para poblaciones de Corea y China, pero al intentar asociar esos SNP en poblaciones europeas han dado una falta de asociación.

El gen VAX1 o ventral homeobox1, factor de transcripción expresado en el paladar de ratones, también es fuerte candidato para malformaciones craneofaciales.⁹

Recientes estudios GWAS (*Estudio de asociación del genoma completo*) en poblaciones europeas con F.O pudieron asociar un locus de VAX1 y FO.

Una secuenciación de isoformas de VAX1 en 384 pacientes y 384 controles, en Europa central, se encontraron 18 SNPs, de los cuales 15 no se habían reportado anteriormente. Las variantes observadas se investigaron respecto a la co-segregación familiar u ocurrencia espontánea.

Al igual que sucede con MSX1, estudios realizados en una población brasileña, intentaron buscar asociación entre las F.O y SNP de VAX1, estudiados con anterioridad en poblaciones de Europa y Asia, sin encontrar asociación entre estos y FO, lo que determina que cada población tiene alelos distintos asociados con FO. El gen BMP4 es miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante TGFB, y es un fuerte candidato, ya que las señales de las BMP regulan muchos aspectos del desarrollo esquelético, incluyendo diferenciación de osteoblastos, condrocitos, formación de cartílago y hueso, patrón mesodérmico y desarrollo craneofacial.^{20,21}

En ratones la expresión de BMP4 se localiza en el sitio de fusión de la prominencia facial. La inactivación en ratones transgénicos resulta en fisuras aisladas de labio,

además Bmp4 aparece para demarcar las células en el proceso nasal lateral y nasal medial que finalmente se pondrá en contacto y se fusionan entre sí⁸, implicando que la función en el ectodermo de los procesos faciales es regular la fusión del labio.^{20,21} La reducción o la sobreexpresión de BMP en los primordios faciales en embriones de pollo alteran el labio normal y los procesos de fusión paladar primario, demostrado un posible papel de las BMP en el cierre del labio superior y el paladar primario en la cara de pollo embrionario. Bmp4 participaría en la mediación de los procesos de fusión, posiblemente, a través de la apoptosis de las células durante la morfogénesis del tercio medio facial.

Lidral y Moreno realizaron metaanálisis sobre estudios de escaneo de genoma completo GWAS que evidenciaron asociación entre FLAP-NS y la región cromosómica 14q21-24 en humanos.^{19,21}

En un estudio de asociación en una población china usando SNP no sinónimas de BMP4, se describió que el portador del alelo mostró un incremento en el riesgo FLP no sindrómico, además reportes que señalan una interacción entre un alelo de BMP y factores ambientales, como tabaquismo materno pasivo en la expresión de FLP no sindrómico.

Suzuki et al. (2009) analizaron la secuencia de codificación de BMP4 en e pacientes con microformas de fisura, fisuras subepiteliales y con labio fisurado, detectando mutaciones con pérdida de sentido y sin sentido en los pacientes con microformas de fisura (0,7%). Estas mutaciones no se encontraron en la muestra de control. Por lo que resultados apoyan el papel de BMP4 en la patogénesis en el fenotipo de las fisuras.

En un estudio realizado en población chilena que considero 167 casos de FLAP-NS , donde 115 fueron esporádicos y los otros mostraron historial familiar positivo, se detectaron tres nuevas variantes que son causas potenciales en promotores de BMP4 y que pueden contribuir con un 1.2% de los nacimientos detectados, así como un SNP alelo de este puede ser factor de riesgo, esto en concordancia con Suazo

y cols que al estudiar 3 SNP de Bmp4 encontraron asociación con un Haplotipos, que incluía 2 de los 3 SNPs, y FLAP-NS en población chilena.¹⁵

Conclusión

Podemos concluir que las Fisuras orales no sindrómicas pueden ser originadas por alteraciones y modificaciones en distintos genes.

Debido a que cada gen participa en procesos distintos del desarrollo embrionario de la cara, las alteraciones que encontremos, sean de paladar primario, secundario, o ambas, dependerán del gen que se encuentre mutado (SNP), por lo tanto, tendremos un fenotipo específico de fisuras para cada gen mutado, y que las distintas formas alélicas que encontremos, serán específicas para cada población y raza, por lo que futuros estudios deberían centrarse en los alelos que sean más prevalentes de la población Chilena y sudamericana. Dichos estudios pueden ayudar a comprender como se desarrolla y transmite esta malformación a nivel de población. Una alta prevalencia de genes mutados presentes, nos indicaría que a futuro se puede dar un aumento de casos, ya que todos los genes, incluidos los que se asocian positivamente con fisuras, se heredan en la descendencia.

El primer caso clínico referente a los hermanos gemelos, gracias al cariotipo podemos descartar algún síndrome cromosómico presente, además de la acción de factores teratógenos ausentes en la entrevista. Sabemos además que existe historial positivo en la línea familiar materna, esto sugiere sustentado en la evidencia una recurrencia familiar².

Respecto al segundo caso, el padre de la afectada también es afectado, asociando por ende un alto riesgo de recurrencia familiar, y sabiendo además que en parientes de primer grado se estima que el riesgo es de 32 veces mayor que para un individuo sin historial de fisuras orales.

Se podría concluir que es posible que la etiología de las Fisuras en estos pacientes tenga un componente genético importante asociado a mutaciones en algún gen, ya que muchos otros factores no genéticos han podido ser descartados.

IMÁGENES



Imagen N°1 y 2: Caso N°1, Fisura unilateral de Labio del lado derecho.



Imagen N°3 y 4, Paciente N°2, Fisura Labio Alveolo Palatina unilateral del lado izquierdo.

Número : 130524082	Nombre : LUCAS IGNACIO RAMIREZ BELLO
Fecha Ingreso : 24/05/2013 10:10	Nombre RN :
Rat : 24209958-3	Solicitado Por (Dr/a) : MEDICO EXTERNO
Nro. Atención : 1587706	Procedencia : UT UNIDAD TOMA MUESTRA
Pieza :	

LABORATORIO DE CITOGENETICA
INFORME DE CARIOGRAMA

Nº : S4924
 TIPO DE MUESTRA : Sangre Periférica
 MEDIO DE CULTIVO : GTG
 TECNICA DE BANDEO : MEDIUM 199 + 5% SBF

NUMERO DE CROMOSOMAS	<45	45	46	47	48	>48	TOTAL
NUMERO MITOSIS			20				20

CARIOTIPO : 46,XY
 COMENTARIO : En todas las mitosis analizadas se encontraron 46 cromosomas, sin anomalías estructurales.

Carla González Salinas
 CARLA GONZALEZ SALINAS
 Tecnólogo Médico

Dra. Eliana Selman
 DRA. ELIANA SELMAN
 Médico Genetista

Laboratorio adherido a control de calidad externo (PCEC) de Instituto Salud Pública
 Usuario Válida :
 Fecha Validación :
 Usuario Informa : Ppccira

CLINICA Sanatorio Alemán Laboratorio de Citogenética

Nombre Paciente: S4924
 Número Paciente: S4924
 Fecha: 28/06/13

Coordenadas: 155.8/11.2
 Portabjeto: B

Imagen N°5, Cariograma paciente N°1

Número : 130524072	Nombre :
Fecha Ingreso : 24/05/2013 9:52	Nombre RN :
Rat : 24209975-3	Solicitado Por (Dr/a) : MEDICO EXTERNO
Nro. Atención : 1587705	Procedencia : UT UNIDAD TOMA MUESTRA
Pieza :	

LABORATORIO DE CITOGENETICA
INFORME DE CARIOGRAMA

Nº : S4923
 TIPO DE MUESTRA : Sangre Periférica
 MEDIO DE CULTIVO : MEDIUM 199 + 5% SBF
 TECNICA DE BANDEO : GTG

NUMERO DE CROMOSOMAS	<45	45	46	47	48	>48	TOTAL
NUMERO MITOSIS			20				20

CARIOTIPO : 46,XY
 COMENTARIO : En todas las mitosis analizadas se encontraron 46 cromosomas, sin anomalías estructurales.

Carla González Salinas
 CARLA GONZALEZ SALINAS
 Tecnólogo Médico

Dra. Eliana Selman
 DRA. ELIANA SELMAN
 Médico Genetista

CLINICA Sanatorio Alemán Laboratorio de Citogenética

Nombre Paciente: S4923
 Número Paciente: S4923
 Fecha: 27/06/13

Nº Folio: 5
 Coordenadas: 155.3/9.9
 Portabjeto: B

Imagen N°6: Cariograma paciente N°2



Imagen N°7: Paciente N°3, cicatriz labio unilateral izquierda.

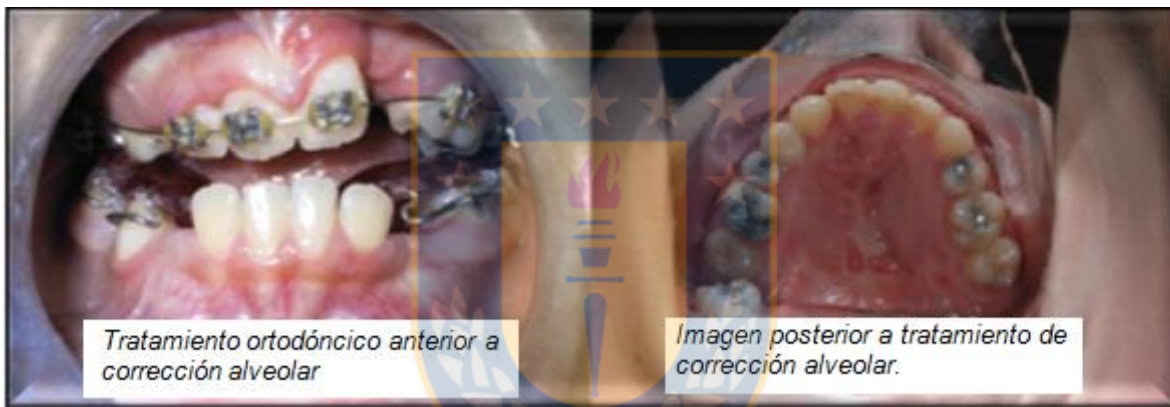


Imagen N°8: Cicatriz proceso alveolar y paladar, unilaterales.

Referencias bibliográficas.

- 1- Ministerio de salud. Guía Clínica Fisura Labiopalatina. Santiago: Minsal, 2009. ISBN : 978-956-8823-14-6.
- 2 - Borrero DC, Gutiérrez SP, Izaguirre DM, Otero LM. Caracterización fenotípica de la morfología facial en un grupo de población africana con fisuralabio-palatina no sindrómica. Univ Odontol. 2010(Ene-Jun); 29(62): 11-18.
- 3- Abreu L, Castro J, Kobayashi G, Passos-Bueno M. *Human Genome Research Center, Institute of Biosciences, University of Sao Paulo, 05508-090 Sao Paulo, SP, Brazil*

- 4- Leslie EJ, Marazita ML. 2013. Genetics of cleft lip and cleft palate. *AmJ Med Genet*
Part C Semin Med Genet 163C:246–258.
- 5-Chavarriaga Rosero J, González Caicedo MX. Prevalencia de labio y paladar hendido: aspectos generales que se deben conocer. Revisión bibliográfica. *Revista Nacional de Odontología*.2010; 6(11):70-81.
- 6-Nayereh Nouri, Padideh Karimi, Salehi Mansoor, Mehrdad Memarzadeh, Hamid Ganji, Maryam Sedghi. An insight into genetics of non-syndromic cleft palate. *Adv Biomed Res* 2013;2:6.
- 7- Gisella González Gutiérrez, Cristian Vergara Núñez. “Asociación entre la prevalencia al nacimiento de nacidos vivos con fisuras orales y el terremoto de magnitud 8,8 y tsunami en la región del maule” Universidad de Chile, Facultad de Odontología, Instituto de Rehabilitación de Malformaciones y Deformaciones Máxilofaciales (I.R.M.A.D.E.M.A.) Santiago - Chile2012.
- 8-Nazer J. Anomalías congénitas estructurales en el recién nacido. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile* 2002;13(4).
- 9- Singh S, Singh V. A comprehensive review of the genetic basis of cleft lip and palate. *J OralMaxillofac Pathol*. 2012;16(1):64-72.
- 10-Hernandez R, Werler M, Romitti P, Sun L, Anderka M. Nonsteroidal antiinflammatory drug use among women and the risk of birth defects. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206(228):1-8.
- 11- Correa A. Parental age as a risk factor for non-syndromic oral clefts:A meta-analysis. Instituto de Estudos em Saú de Coletiva, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Horacio Macedo, S/N,Ilha do Fundao - Cidade Universitaria, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21941-598, Brazil *journal of dentistry*, 40(2012). 3–14
- 12-Sibele Nascimento de Aquino, Ana Camila Messetti, Elizabete Bagordakis, Hercílio Martelli-Júnior, Mario Sergio Oliveira Swerts, Edgard Graner and Ricardo D Coletta* Polymorphisms in *FGF12*, *VCL*, *CX43* and *VAX1* in Brazilian patients with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate *BMC Medical Genetics* 2013, 14:53

13-Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Spinelli G, Lunardi S, Carinci F. Lack of association between common polymorphisms of epidermal growth factor receptors and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009 Jul;73(7):929-31.

14-Rafiqdoost Z, Rafiqdoost A, Rafiqdoost H, Hashemi M, Khayatzadeh J, Eskandari-Nasab E. Investigation of FGF1 and FGFR gene polymorphisms in a group of Iranian patients with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.

Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2014 May;78(5):731-6

15-Liliane Todeschini de Souza, Thayne Woycinck Kowalski, Ana Paula Vanz, Roberto Giugliani. *TGFA / Taq I* polymorphism and environmental factors in nonsyndromic clefts in Southern Brazil. *Braz Oral Res. (São Paulo)* 2012 Sep-Oct;26(5):431-5

16-José Suazo, Julio C Tapia, José Luis Santos, Víctor G Castro, Alicia Colombo and Rafael Blanco Risk variants in BMP4 promoters for nonsyndromic cleft lip/palate in a Chilean Population. *BMC Medical Genetics* 2011, 12:163. <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/163>

17- Alexandre R Vieira, Silvia Castillo Taucher, Teresa Aravena, Carmen Astete, Patricia Sanz, María Eugenia Tastets, Luis Monasterio, Jeffrey C Murra.

Mutational analysis of the muscle segment homeobox gene 1 (MSX1) in Chilean patients with cleft lip/palate. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 816-822

18-Carinci F, Rullo R, Farina A, Morano D, Festa VM, Mazzarella N, et al.

Non-syndromic orofacial clefts in Southern Italy: pattern analysis according to gender, history of maternal smoking, folic acid intake and familial diabetes. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2005;33:914.

19-Kim NY, Kim YH, Park JW, Baek SH. Association between MSX1 SNPs and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Korean population.

J Korean Med Sci. 2013 Apr;28(4):522-6.

20- : Lu Y, Liu Q, Xu W, Li Z, Jiang M, et al. (2013). *TGFA* and *IRF6* Contribute to the Risk of Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in Northeast China. *PLoS ONE* 8(8): e70754. doi:10.1371/journal.pone.0070754

21- Jagomägi T, Nikopensius T, Krjutskov K, Tammekivi V, Viltrop T, Saag M.

MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate.

Eur J Oral Sci. 2010 Jun;118(3):213-20.

