

Asociación de las mutaciones de los genes AXIN2 y MSX1 con Fisura labiopalatina no sindrómica en familias colombianas

Herrera P¹, Pena T¹, Suárez A², Otero L³

1. Odontóloga Residente Posgrado de Ortodoncia PUJ

2. Odontóloga-Epidemióloga U. El Bosque, docente PUJ

3. Odontóloga Especialista en Ortodoncia, Magíster en Microbiología con énfasis en Genética, PhD en Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Javeriana

Resumen

Objetivo: Identificar la asociación entre los SNPs rs6446693 del gen MSX1 y el SNP rs2240308 del gen AXIN2 en padres colombianos, con presencia de fisura labio palatina no sindrómica en su descendencia. **Método:** Se analizó el SNP rs6446693 del gen MSX1 y el SNP rs2240308 del gen AXIN2 a partir de muestras de saliva en padres y madres colombianos con hijos diagnosticados con FLPNS (fisura labiopalatina no sindrómica). Se realizó un análisis de genotipificación para los SNPs de los genes candidatos MSX1 (rs6699432) y AXIN2 (rs2240308) mediante PCR en un ABI prism 7900 y software Genius ®. La asociación de los polimorfismos con FLPNS se evaluó mediante una prueba Chi Cuadrado y el cálculo de Odds Ratios (OR) de cada genotipo a partir de un modelo de regresión logística. **Resultados:** Se evidenció un riesgo estadísticamente significativo para el desarrollo de FLPNS en la descendencia de padres (OR=8.5; IC: 4,09-17,95; p<0,0001) con presencia del SNP Rs2240308 del gen AXIN2. No se evidenció asociación del SNP rs6446693 del gen MSX1 con FLPNS. (p=0,024) **Conclusiones:** Estos hallazgos evidencian una asociación positiva para el SNP rs2240308 del gen AXIN2 con el aumento del riesgo de FLPNS en población colombiana.

Palabras clave: Fisura labio palatina no sindrómica, Colombia, polimorfismo, MSX1, AXIN2.

Abstract

Objective: To evaluate the association between MSX1 rs6446693 polymorphism and AXIN2 rs2240308 polymorphism in Colombian parents with non-syndromic cleft lip and palate (NSCLP) in their progeny. **Design:** MSX1 SNP rs6446693 and AXIN2 SNP rs2240308 were analyzed. Genomic DNA was extracted from saliva samples. Polymerase chain reaction was carried out. The amplifications were performed in ABI PRISM 7900 genetic analyzer through software Genius. Chi-square and odds ratio tests were used to determine the association between the genotypes and the risk to the NSCLP in a Colombian sample. **Results:** A significant statistical difference (OR=8.5; IC: 4,09-17,95; p<0,0001) was found between the parents who carried AXIN2 SNP rs2240308. No association was found between MSX1 SNP rs6446693 and the risk to NSCLP (p=0,024). **Conclusions:** These findings show a positive association between the AXIN2 SNP rs2240308 and the risk to NSCLP in Colombian population.

Keywords: non-syndromic cleft with palate, Colombia, polymorphism, MSX1, AXIN2

INTRODUCCIÓN

La Fisura Labio palatina No Sindrómica (FLPNS) es una anomalía congénita de las estructuras craneofaciales, la cual representa un grupo de defectos del nacimiento, donde se evidencia una alteración en el desarrollo de las estructuras de la cavidad oral (labio y paladar) caracterizada por una alteración de eventos coordinados como diferenciación celular, migración, crecimiento y apoptosis a nivel del primordio facial(1-4). El 70% de los casos de fisura labio palatina corresponde a la entidad no sindrómica y el 30% a FLP asociado a síndromes⁽⁵⁾. La incidencia de fisura labio palatina no sindrómica (FLPNS) tiene una alta variabilidad de acuerdo con el grupo racial, geografía y etnia siendo la más alta en población Asiática con 1 en 500 nacidos vivos, amerindia con 3,6 x 1000 nacimientos, en caucásicos con 1 en 1000 nacimientos, y cerca de 1 en 2500 nacimientos en población afrodescendientes (6, 7). En Colombia se ha reportado una prevalencia de 0.07% según el ENSAB IV (2013-2014)(8), en este sentido, dependiendo de la zona geográfica y el nivel socioeconómico de la población, el sexo masculino presenta mayor afectación de FLP (Fisura labio palatina).

La etiología de la fisura labio palatina no sindrómica (FLPNS) es multifactorial y heterogénea en los seres humanos, influenciada principalmente por factores genéticos y ambientales (1). Con respecto, a los factores genéticos, las fisuras orofaciales muestran una alta segregación familiar, lo cual sugiere que el componente genético juega un papel importante en la etiología de esta patología. Aunque se han llevado a cabo diversas investigaciones en genética, la búsqueda de los genes principales que determinan el riesgo de presentar fisuras orofaciales es permanente. En cuanto a los genes involucrados en la etiología de FLPNS se ha identificado que esta patología es de carácter poligénico multifactorial con más de 20 genes que han sido relacionados con la etiología de FLPNS, con mutaciones de genes que varían según el origen étnico de la población estudiada, dentro de los cuales se incluyen: FGFR1, FGF8, BMP4, FOXE11, TP63, PAX7, VAX1, IRF6, TBX22, TBX1, CDH1, PAX9, AXIN 2 y MSX1(1,8-10).

Se ha demostrado que los genes MSX1 y AXIN2, poseen un rol representativo en la etiología de FLPNS, siendo fuertes genes candidatos. El gen MSX1 un gen maestro, factor de transcripción perteneciente a la familia de genes homeobox MSX, involucrado en la morfogénesis craneofacial, específicamente de los maxilares y la embriogénesis dental (6, 11). En humanos las mutaciones de MSX1, y la interacción de estas con mutaciones de otros genes como PAX9 e IRF6 se encuentran involucradas en la etiología de FLPNS y agenesia dental (12, 13). Aunque se han identificado diversas mutaciones en MSX1 asociadas a FLPNS, se ha evidenciado que existe una alta variabilidad entre poblaciones y las diferentes mutaciones de este gen.(6, 14). El SNP rs6446693 ha sido fuertemente asociado con la etiología y susceptibilidad de FLPNS, sin embargo, estos resultados varían de acuerdo con el grupo étnico de la población estudiada (3, 15-18). Gurramkonda y cols, evidenciaron en población India que el SNP rs6446693 no evidencia asociación con la etiología de FLPNS, por el contrario, Jagomagi y cols. en 2010, reportan asociación significativa en población Asturiana (19). Con respecto a Latinoamérica, Suazo y col en el 2010 reportan que rs6446693, influye significativamente en la etiología de FLPNS en población chilena(20). Sin embargo, Cardoso y cols. en 2013, reportan que no hay relación entre rs6446693 con la etiología de FLPNS en población brasileña (3, 21).

El gen AXIN2 (proteína de inhibición de AXIS) regulador de la vía de señalización WNT, especialmente de la B-Catenina, es esencial en el desarrollo del esqueleto axial e interviene en la morfogénesis del cráneo y de las estructuras dentales. Se ha demostrado que las mutaciones de este gen tienen un papel importante en la etiología genética de la FLPNS así mismo se encuentra relacionadas con agenesia dental y cáncer(18,22-24). El SNP rs2240308 ha sido estudiado en la etiología de FLPNS. Andrade y cols (2011), reportaron que éste SNP no está asociado con la etiología de FLPNS, no obstante, en una muestra expandida de población estadounidense, este SNP muestra asociación significativa con esta entidad(24,25). Posteriormente en un estudio llevado a cabo por Letra y cols (2012) se observó la asociación de AXIN2 con el aumento de riesgo a FLPNS, además se reportó la interacción de este gen con genes como IRF6 y CDH1(26) Por el contrario, en un estudio realizado por Han y cols. en 2014 en población china, concluyen que la presencia de este polimorfismo no está asociada con el aumento de riesgo para FLPNS, por lo tanto, el riesgo asociado a esta entidad varía de una población a otra.

Existe evidencia científica que sustenta la participación de los genes AXIN2 y MSX1 en la etiología de FLPNS (27-29), sin embargo, los hallazgos reportados previamente exponen que la etiología genética varía de acuerdo con la población, y aspectos relacionados con el nivel socioeconómico y grupo étnico (25). En Colombia no hay estudios que evalúen la asociación individual y concomitante de los SNPs rs6446693 del gen MSX1 y rs2240308 del gen AXIN 2 con el aumento del riesgo de FLPNS.

El objetivo de la presente investigación fue identificar la asociación entre las

El objetivo de la presente investigación fue determinar la asociación entre las mutaciones rs6446693 del gen MSX1 y rs2240308 del gen AXIN2 en padres colombianos, con la presencia de fisura labio palatina no sindrómica en su descendencia.

Materiales y Métodos

La presente investigación se desarrolló bajo el diseño observacional analítico de casos y controles, asimismo se desarrolló un análisis de ligamiento. La población del grupo caso, estuvo constituida por 69 tríos (padre-madre-probando) seleccionados mediante la técnica de muestreo no probabilística intencional, diagnosticados mediante examen clínico por un especialista en genética con el fin de evaluar la presencia de fisura labio palatina no sindrómica (FLPNS) y descartar síndromes asociados a cualquier tipo de fisura orofacial. El estudio incluyó padres biológicos con una edad comprendida entre 20-65 años, sin antecedentes de fisura labio palatina u otra anomalía de origen craneofacial. El grupo control estuvo conformado por 149 madres y padres biológicos de individuos sanos, sin antecedentes de FLPNS u otra anomalía craneofacial. Los individuos con posible malformación sindrómica o alteración neuronal de cualquier tipo fueron excluidos. La muestra fue seleccionada de tres facultades de odontología de tres regiones del país: Cartagena, Pasto, Bogotá, con el fin de representar la población colombiana y las diferencias étnicas entre ellos. El tamaño de la muestra se determinó con relación a la frecuencia del evento reportada para la población colombiana en el último estudio nacional de salud bucal ENSAB IV (2013-2015). Asimismo se analizó el comportamiento epidemiológico en el contexto mundial: prevalencia de 10 casos por cada 10,000 nacidos vivos (5, 8).

Las variables analizadas en la presente investigación se relacionaron con los SNPs (rs6699432) de MSX1 y (rs2240308) de AXIN2 como variables dependientes y la presencia de fisura labio palatina no sindrómica en la descendencia como variable de independiente. Aspectos relacionados con la edad de los padres, el género, el grupo étnico, estrato socioeconómico, procedencia, región de residencia, antecedentes de FLPNS y agentes teratógenos representaron las variables de confusión, las cuales fueron controladas a través del cuestionario basado en el estudio colaborativo norteamericano de malformación congénitas (Castilla & Orioli)(30).

El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de investigación y Ética de la Pontificia Universidad Javeriana. Los padres de los individuos afectados aceptaron y firmaron un consentimiento informado y posteriormente se realizó el diligenciamiento de la historia clínica y un cuestionario basado en el estudio colaborativo latinoamericano de malformaciones congénitas ECLAM. Todos los pacientes que presentaran antecedentes de otros síndromes craneofaciales y antecedentes de exposición a agentes teratógenos fueron excluidos.

Extracción de ADN y genotipificación

Se tomaron muestras de saliva (2ml) para cada individuo afectado y no afectado y sus padres, se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de saliva mediante el kit de extracción *Oragene*®. Posteriormente, las muestras de ADN fueron enviadas al laboratorio MCLAB en la ciudad de Los Ángeles, Estados Unidos, con el fin de realizar un análisis de genotipificación para los SNPs de los genes candidatos MSX1 (rs6699432) y AXIN2 (rs2240308). El análisis de las mutaciones de MSX1 (rs6446693) y AXIN2 (rs2240308) se realizó mediante el software Genius.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se evaluó la asociación de los polimorfismos, con la fisura labio palatina mediante una prueba Chi Cuadrado. Se realizó el cálculo de los Odds

Ratios (OR) de cada genotipo a partir de un modelo de regresión logística para cuantificar la magnitud de la asociación de los SNPs estudiados y FLPNS con un intervalo de confianza del 95%; asimismo, se aplicó el test de Hardy Weimberg con el fin de evaluar el equilibrio genético de la población estudiada.

Resultados

Las características sociodemográficas de los grupos de estudio y sus distribuciones se obtuvieron a partir de un análisis de frecuencia, en la cual se evidenció que la edad promedio de los padres fue de 35,1 años y que el 80% pertenecían al grupo étnico mestizo. Por otro lado, el 77.7% de los participantes refirieron no haber estado expuestos a teratógenos.

Los resultados del análisis de asociación entre los genes MSX1 (rs6446693) y AXIN2 (rs2240308) con FLPNS obtenidos a partir de la prueba Chi cuadrado de Pearson evidencia la frecuencia de los dos genotipos reflejando que las dos mutaciones presentes simultáneamente en los padres no representan un factor de riesgo para desarrollar FLPNS en su descendencia con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,003$) y ($p=0,024$) (Tabla 1). En cuanto al gen AXIN2 (rs2240308), los resultados sugieren que los padres sin esta mutación presentan menor riesgo de desarrollar FLPNS en su descendencia (OR:0,4; IC:0,221-0,262; $p:0.003$) es decir, la ausencia de esta mutación en los padres se podría considerar un factor protector para desarrollar FLPNS en su descendencia. (Tabla 1)

Tabla 1. Frecuencia y asociación de MSX1 (rs6446693) y AXIN2 (rs2240308) en Casos y Controles.

Gen	% Casos Con Mutación	% Casos Sin Mutación	%Controles Con Mutación	%Controles Sin Mutación	p	OR	IC		n
							Lim Inf-	Lim Sup	
Axin2 (Rs2240308)	52.2%	47.8%	73.2%	26.8%	0,003	0,4	0,221-	0,076	218
Msx1 (Rs6446693)	41.8%	58.2%	41.12%	58.8%	0,242	0,7	0,262-	0,957	218

Los resultados del análisis de la segregación del SNP rs6446693 del gen MSX1 evidencian que al separar a madres y padres para determinar si existe asociación ligada al género se encontró que las madres que no presentaban la mutación tenían menor riesgo de tener hijos con FLPNS (OR:0,22; IC: 0,09-0,5; $p: 0,001$). De igual manera, los padres que no presentaban esta mutación tenían menor riesgo de tener hijos con FLPNS (OR: 0,43; IC: 0,20-0,94; $p:0,021$) (Tabla 2).

Tabla 2. Asociación entre la presencia de la mutación rs6446693 del gen MSX1 en padre y madre con la presencia de FLPNS en su descendencia.

Gen	% Casos Con Mutación	% Casos Sin Mutación	% Controles Con Mutación	%Controles Sin Mutación	P	OR	IC		n
							Lim Inf-	Lim Sup	
Msx1 Padre	13,6%	38,4%	29,6%	18,4%	0,001	0,22	0,09-	0,5	218
Msx1 Madre	17,96%	32,03%	38,12%	21,87%	0,021	0,43	0,20-	0,94	218

Los resultados del análisis de la segregación del SNP rs2240308 del gen AXIN2 de padres y madres a los hijos con FLPNS evidencian que cuando el padre o la madre presentan esta mutación aumenta el riesgo (OR:8,5; IC:4,09-17,95; $p:0,001$) ;(OR:8,1; IC: 3.91-16.94; $p:0.001$) de desarrollar FLPNS en la descendencia. siendo esta

con el riesgo de presentar la enfermedad. El riesgo de desarrollar FLPNS en la descendencia, siendo solo asociación estadísticamente significativa (Tabla 3).

Tabla 3. Asociación entre la presencia de la mutación rs2240308 del gen AXIN2 en padre y madre con la presencia de FLPNS en su descendencia.

Gen	% Casos Con Mutación	% Casos Sin Mutación	% Controles Con Mutación	%Controles Sin Mutación	p	OR	IC	n
Axin2 Padre	37%	63%	12.4%	87.6%	0,001	8,5	4,09- 17,95	218
Axin2 Madre	37%	63%	13.1%	87.9%	0,001	8,1	3,91-16,94	218

Al evaluar la asociación entre las mutaciones MSX1 (rs6446693) y AXIN2 (rs2240308) presentes simultáneamente en padres o madres con el riesgo de FLPNS en su descendencia, se encontró una tendencia a la asociación (OR:23,14; IC:6,4-83,4; p:0,001) (Tabla 4), sin embargo, no se puede establecer relación debido al limitado número de casos y controles que presentaron las dos mutaciones simultáneamente.

Tabla 4. Asociación entre la presencia de mutaciones AXIN2 / MSX1 concomitantes en padre y madre con la presencia de las mutaciones AXIN2 / MSX1 concomitantes en hijos.

Gen	N Casos Con Mutación	N Casos Sin Mutación	N Controles Con Mutación	N Controles Sin Mutación	P	Or	Ic	n
Msx1/Axin2 Padre	5	10	2	51	0,001	12,75	2,16-75,18	68
Msx1/Axin2 Madre	15	8	5	56	0,001	21	5,99-77,61	84
Msx1/Axin2 Padre y Madre	15	7	5	54	0,001	23,14	6,4-83,4	81

Discusión

En el presente estudio se realizó un análisis de la asociación entre rs6446693 del gen MSX1 y rs2240308 del gen AXIN2 con el riesgo de FLPNS en familias colombianas. En cuanto al gen AXIN2, los hallazgos evidenciaron que la presencia de rs2240308 en el padre o la madre aumenta el riesgo de desarrollar FLPNS en la descendencia con un OR de 8,5 y 8,1 respectivamente y una asociación estadísticamente significativa p:0,001. Estos hallazgos son similares al estudio de casos y controles llevado a cabo por Letra y cols (2009) en población de Brasil donde se observó una correlación potencial entre este SNP y FLPNS, atribuida a la dificultad de controlar la variabilidad étnica en la población estudiada (23). Estas observaciones fueron verificadas en una siguiente investigación efectuada por Menezes y cols (2009), en la cual evidenciaron una asociación significativa de la mutación rs 2240308 con FLPNS en familias catado-unidenses(22); posteriormente, en un estudio comparativo de 682 familias

estadounidenses(22); posteriormente en un estudio comparativo de 682 familias diagnosticas con FLPNS procedentes de diferentes poblaciones (Argentina, Estados Unidos, España, Asia, Hungría, Guatemala) realizado por Letra y cols. (2012), se confirmó la asociación de rs 2240308 con la susceptibilidad de desarrollar FLPNS, soportando el rol del gen AXIN2 en la etiología de la misma, específicamente en población asiática y estadounidense (22, 26). En contraste, Mostowska y cols (2012) evaluaron el SNP rs 2240308 en población de Polonia, los resultados obtenidos indicaron que este genotipo no estaba relacionado con el aumento de riesgo de FLPNS (31); hallazgos similares fueron observados en el estudio de Vieira y cols (2014) en población de Letonia (OR = 0.85) y en un estudio comparativo realizado por Han y cols (2014) en el cual a partir de una muestra de 1201 individuos de población china, no se evidenció asociación significativa entre el genotipo de interés y FLPNS, indicando que la relación de las mutaciones del gen AXIN2 y FLPNS varían de acuerdo a la población estudiada (24, 31, 32).

El gen MSX1 ha sido consistentemente asociado con el riesgo de presentar FLPNS en diferentes poblaciones. Se ha evidenciado que las mutaciones de este gen contribuyen al 2% del desarrollo de fisuras orofaciales (33, 34). En el presente estudio se evaluó el SNP rs6446693. Los resultados reflejaron que, a pesar de existir segregación de la mutación de los padres a la descendencia, ésta no se encuentra asociada con el riesgo de desarrollar FLPNS. Este hallazgo es consistente con los resultados publicados en estudios previos. Suazo y cols (2010) a partir de una muestra de población chilena, estudiaron la asociación de SNPs del gen MSX1, dentro de los cuales se encontraba el genotipo de interés del presente estudio con FLPNS, identificando que el SNP rs6446693 no se podía considerar un marcador de riesgo para esta anomalía a pesar de ser segregada por los padres(16). Con respecto a la población de Brasil, Cardoso y cols (2013) desarrollaron un estudio de casos y controles evaluando la asociación de este SNP con FLPNS. Los hallazgos de este estudio revelaron que a pesar de evidenciar un OR de 1.8, este valor no era estadísticamente significativo para considerarse un factor de riesgo para FLPNS (18) resultado semejante Huang y Cols. (2011) quienes de igual forma no evidenciaron diferencias significativas entre este SNP y FLPNS en población china (17). En población del Sur de India, Gurrakonda y cols (2015) evaluaron la asociación de este SNP con FLPNS obteniendo resultados similares a los estudios previamente mencionados en los que no se evidenció asociación significativa con respecto al aumento del riesgo de FLPNS(3). Posteriormente Ibarra y cols (2016) en población mexicana y Blanco y cols (2017) en población chilena, comprobaron los resultados previamente obtenidos en los cuales no se observó asociación significativa entre el genotipo de interés y FLPNS (7, 35). Los hallazgos descritos anteriormente fueron analizados por Min gu y cols (2018) donde confirmaron que el SNP rs6446693 no se encuentra asociado con FLPNS, a pesar del hallazgo evaluado por Jagomagui (2010) quien observó una fuerte asociación entre este SNP y el riesgo de desarrollar FLPNS en población Estoniana; este resultado el cual es discrepante con los estudios previos, se puede atribuir a la heterogeneidad genética, a la dificultad del controlar la exposición a factores teratógenos asociados y a la etiología multifactorial de la fisura labio palatina no sindrómica(19).

En el presente estudio, los resultados del análisis de las mutaciones de los dos genes (rs6446693 del gen MSX1 y rs2240308 del gen AXIN2) simultáneas en padre y madre con el riesgo de desarrollar FLPNS en su descendencia fueron evaluadas evidenciando una tendencia a la asociación con un OR de 12,75 lo cual indicaría que existe un riesgo asociado con esta anomalía craneofacial, sin embargo, no se puede establecer esta relación debido a la amplitud del intervalo de confianza atribuido al tamaño de la muestra limitado.

En cuanto a la interacción de los genes estudiados, a la fecha no existen estudios que relacionen la concomitancia de los SNPs de interés. Sin embargo se ha evaluado la interacción del gen MSX1 (rs6446693) con genes como TGFB3 (rs2268625), IRF6 y

BMP4 evidenciando un incremento en el riesgo de desarrollar FLPNS, aunque no se demuestre la asociación de estos genes con FLPNS evaluados individualmente en algunas poblaciones (7, 19, 36). Con respecto al gen AXIN2, se ha evaluado su interacción con genes como IRF6 y CDH1 en el aumento del riesgo de FLPNS (32).

Las diferencias en los resultados obtenidos en la presente investigación en comparación con los estudios previamente mencionados posiblemente se pueden explicar a partir de la heterogeneidad genética, la variabilidad poblacional debido a la alta tasa migratoria de los primeros pobladores en Colombia (28, 37) y la posible participación de otros genes, como TGFB3, TGFa, VAX1, TBX22, PAX9, entre otros, en la etiología de la FLPNS debido a su naturaleza poligénica (1, 6, 10, 14).

Aunque se estableció una asociación positiva entre el polimorfismo rs2240308 del gen AXIN2 en la población Colombiana y además se identificó una tendencia a la concomitancia entre MSX1 y AXIN2, este último hallazgo se debe analizar con cautela debido a que el tamaño de la muestra analizada fue limitado, por lo tanto, se recomiendan estudios futuros que involucren un mayor tamaño de la muestra e identifiquen la interacción de rs2240308 y rs6446693 en diferentes grupos étnicos en la población Colombiana.

Conclusión

Los resultados de este estudio sugieren una asociación positiva de la mutación rs2240308 del gen AXIN2 en padres y madres con el aumento de riesgo de desarrollar FLPNS en su descendencia, por el contrario, no se evidenció asociación del SNP rs6446693 gen MSX1 con el riesgo de FLPNS.

Agradecimiento y Financiación

La ejecución del presente estudio fue posible gracias al apoyo y financiación de la Asociación Colombiana de Facultades de Odontología ACFO y a la Pontificia Universidad Javeriana.

Bibliografía

1. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(3):167.
2. Beaty TH, Marazita ML, Leslie EJ. Genetic factors influencing risk to orofacial clefts: today's challenges and tomorrow's opportunities. *F1000Research*. 2016;5.
3. Gurrakonda VB, Syed AH, Murthy J, Lakkakula BV. Evidence of the involvement of the polymorphisms near MSX1 gene in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2015;79(7):1081-4.
4. Yu W, Serrano M, Symone San Miguel L, Svoboda KK. Cleft lip and palate genetics and application in early embryological development. *Indian Journal of Plastic Surgery: Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India*. 2009;42(Suppl):S35.
5. Leslie EJ, Marazita ML, editors. *Genetics of cleft lip and cleft palate*. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics; 2013: Wiley Online Library.
6. Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2012;49(1):73-91.
7. Blanco R, Colombo A, Pardo R, Suazo J. Haplotype-based gene-gene interaction of bone morphogenetic protein 4 and interferon regulatory factor 6 in the etiology of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chilean population. *European journal of oral sciences*. 2017;125(2):102-9.
8. Salud MNd. IV Estudio Nacional de Salud Bucal ENSAB IV Colombia 2013. 3 p.

8. Salud pública. IV Estudio Nacional de Salud Bucal ENSAB IV. Colombia 2013. 5 p.
9. Group IW. Prevalence at birth of cleft lip with or without cleft palate: data from the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTCO). 2011.
10. Hartzell LD, Kilpatrick LA. Diagnosis and management of patients with clefts: a comprehensive and interdisciplinary approach. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2014;47(5):821-52.
11. Vieira AR, Meira R, Modesto A, Murray J. MSX1, PAX9, and TGFA contribute to tooth agenesis in humans. *Journal of dental research*. 2004;83(9):723-7.
12. Paradowska-Stolarz A. MSX1 gene in the etiology orofacial deformities. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015;69:1499-504.
13. Aslar Oner D, Tastan H. Association of MSX1 c.* 6C> T Variant with Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in Turkish Patients. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2016;20(7):402-5.
14. Sabbagh HJ, Hassan MHA, Innes NP, Elkodary HM, Little J, Mossey PA. Passive smoking in the etiology of non-syndromic orofacial clefts: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(3):e0116963.
15. Ludwig KU, Wahle P, Reutter H, Paredes-Zenteno M, Muñoz-Jimenez SG, Ortiz-Lopez R, et al. Evaluating eight newly identified susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2014;100(1):43-7.
16. Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Parent-of-origin effects for MSX1 in a Chilean population with nonsyndromic cleft lip/palate. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2010;152(8):2011-6.
17. Huang Y-q, Ma J, Ma M, Deng Y, Li Y-d, Ren H-w, et al. Association between MSX1 variants and oral clefts in Han Chinese in western China. *DNA and cell biology*. 2011;30(12):1057-61.
18. Cardoso M, Bezerra J, Oliveira G, Soares C, Oliveira S, Souza K, et al. MSX1 gene polymorphisms in non-syndromic cleft lip and/or palate. *Oral diseases*. 2013;19(5):507-12.
19. Jagomägi T, Nikopensus T, Krjutškov K, Tammekivi V, Viltrop T, Saag M, et al. MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *European journal of oral sciences*. 2010;118(3):213-20.
20. Tongkobpetch S, Siriwan P, Shotelersuk V. MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population. *Journal of human genetics*. 2006;51(8):671.
21. Vieira A. Unraveling human cleft lip and palate research. *Journal of dental research*. 2008;87(2):119-25.
22. Menezes R, Marazita ML, McHenry TG, Cooper ME, Bardi K, Brandon C, et al. AXIS inhibition protein 2, orofacial clefts and a family history of cancer. *The Journal of the American Dental Association*. 2009;140(1):80-4.
23. Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR. AXIN2 and CDH1 polymorphisms, tooth agenesis, and oral clefts. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2009;85(2):169-73.
24. Han Y, Zhou L, Ma L, Li D, Xu M, Yuan H, et al. The axis inhibition protein 2 polymorphisms and non-syndromic orofacial clefts susceptibility in a Chinese Han population. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2014;43(7):554-60.
25. Andrade Filho P, Letra A, Cramer A, Prasad J, Garlet G, Vieira A, et al. Insights from studies with oral cleft genes suggest associations between WNT-pathway genes and risk of oral cancer. *Journal of dental research*. 2011;90(6):740-6.
26. Letra A, Bjork B, Cooper M, Szabo-Rogers H, Deleyiannis F, Field L, et al. Association of AXIN2 with non-syndromic oral clefts in multiple populations. *Journal of dental research*. 2012;91(5):473-8.
27. Otero L, Gutierrez S, Chaves M, Vargas C, Bermudez L. Association of MSX1 with nonsyndromic cleft lip and palate in a Colombian population. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2007;44(6):653-6.
28. Moreno LM, Arcos-Burgos M, Marazita ML, Krahn K, Maher BS, Cooper ME, et al. Genetic analysis of candidate loci in non-syndromic cleft lip families from Antioquia-Colombia and Ohio. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2004;125(2):135-44.
29. Pengelly RJ, Arias L, Martínez J, Upstill-Goddard R, Seaby EG, Gibson J, et al.

Deleterious coding variants in multi-case families with non-syndromic cleft lip and/or palate phenotypes. *Scientific reports*. 2016;6.

30. Castilla EE, Orioli IM. ECLAMC: the Latin-American collaborative study of congenital malformations. *Public Health Genomics*. 2004;7(2-3):76-94.

31. Mostowska A, Hozyasz KK, Wójcicki P, Lasota A, Dunin-Wilczyńska I, Jagodziński PP. Association of DVL2 and AXIN2 gene polymorphisms with cleft lip with or without cleft palate in a Polish population. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2012;94(11):943-50.

32. Krasone K, Lāce B, Akota I, Care R, Deeley K, Kūchler EC, et al. IRF6 AP-2a binding site promoter polymorphism is associated with oral clefts in Latvia. *Stomatologija*. 2014;16(4):132-6.

33. Cardoso M, Bezerra J, Oliveira G, Soares C, Oliveira S, de Souza K, et al. MSX 1 gene polymorphisms in non-syndromic cleft lip and/or palate. *Oral diseases*. 2013;19(5):507-12.

34. da Silva HPV, Oliveira GHdM, Ururahy MAG, Bezerra JF, de Souza KSC, Bortolin RH, et al. Application of high-resolution array platform for genome-wide copy number variation analysis in patients with nonsyndromic cleft lip and palate. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2018:e22428.

35. Ibarra-Arce A, Albavera-Giles T, Zavaleta-Villa B, de Zárate-Alarcón GO, Flores-Peña L, del Carmen Sierra-Romero M, et al. MSX1 gene polymorphisms in Mexican patients with non-syndromic cleft lip/palate. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2016;90:119-24.

36. Suazo J, Santos JL, Colombo A, Pardo R. Gene-gene interaction for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chilean case-parent trios. *Archives of oral biology*. 2018;91:91-5.

37. Carvajal-Carmona LG, Soto ID, Pineda N, Ortíz-Barrientos D, Duque C, Ospina-Duque J, et al. Strong Amerind/white sex bias and a possible Sephardic contribution among the founders of a population in northwest Colombia. *The American Journal of Human Genetics*. 2000;67(5):1287-95.