

Perfil epidemiológico y presencia de polimorfismos *IFR6* (rs2235371), *TGFA* (rs3771494) en individuos con labio y paladar hendido no sindrómico

Epidemiological profile and presence of *IFR6* (rs2235371), *TGFA* (rs3771494) polymorphisms in individuals with non-syndromic cleft lip and palate

Resumen

Objetivo. Reportar el perfil epidemiológico y presencia de polimorfismos de *IFR6* (rs2235371) y *TGFA* (rs3771494) en individuos con labio y paladar hendido (LPH) no sindrómico. **Métodos.** Serie de casos, centrado en individuos con hendiduras orofaciales (HO), remitidos a la Facultad de Odontología de Durango, México, para su revisión y valoración dentro del periodo comprendido de enero-2018 a diciembre-2019. Se obtuvo información de interés para el estudio sobre las características del embarazo y antecedentes familiares, de las madres de los individuos. Para el análisis y descripción de los datos se utilizó el paquete estadístico R Studio. **Resultados.** El total de casos estudiados fue de 24. Se presentó una mayor frecuencia de hombres (67%), la mayoría de los individuos tuvieron el diagnóstico de LPH al nacer (75%), extensión de afección completa (75%), el lado izquierdo afectado (63%), y cirugías correctivas (62%). Solo el 4% estuvo expuesto al tabaquismo materno (activo y pasivo), el 96% tuvo adecuada ingesta de ácido fólico y hierro; el genotipo de riesgo para *TGFA* (rs3771494) se presentó en el 15% de labio hendido y en el 8% del LPH, y para *IFR6* (rs2235371) solo en el 10% del LPH. **Conclusiones.** La presencia de factores ambientales, genéticos, y el estilo de vida materno mostrado en otras poblaciones, podrían no ser los mismos que intervengan en la aparición y desarrollo de HO no sindrómicas de nuestra localidad, además, la presencia de los genotipos homocigotos polimórficos de los genes de interés podría no condicionar el desarrollo de HO.

Palabras clave: Labio hendido; Fisura del paladar; Polimorfismo; Epidemiología (fuente: DeCS BIREME).

Abstract

Objective. To report the epidemiological profile and the presence of polymorphisms of the *IFR6* (rs2235371) and *TGFA* (rs3771494) genes, in individuals with non-syndromic cleft lip and palate. **Methods.** Case series study, focused on individuals with orofacial clefts, referred to the School of Dentistry of Durango, Mexico, for review and assessment within the period from January 2018 to December 2019. Information of interest for the study was obtained on the characteristics of pregnancy and family history of the mothers of the individuals. For the analysis and description of the data, the statistical software R Studio was used. **Results.** There was a higher frequency of men (67%), most of the

Víctor Hiram Barajas-Pérez ^{1,a,b}, Graciela Zambrano-Galván ^{2,c}, Oscar Eduardo Almeda-Ojeda ^{1,b}, Norith de Jesús Recendez-Santillán ^{3,a}, Edgar García-Torres ^{1,b}

¹ Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Odontología, Victoria de Durango, Durango, México.

² Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Medicina y Nutrición, Centro de Investigación en Alimentos y Nutrición, Durango, México.

³ Universidad de Monterrey, Facultad de Odontología, Monterrey, Nuevo León, México.

^a Especialista Cirugía Oral y Maxilofacial.

^b Magíster en Ciencias Estomatológicas.

^c Doctora en Ciencias Biomédicas.

Correspondencia:

Edgar García-Torres: edgar.garcia@ujed.mx
Predio Canoas s/n, Los Ángeles, 34070 Victoria de Durango, México.
ORCID: 0000-0002-7799-4352

Coautores:

Víctor Hiram Barajas-Pérez: hiram.barajas@ujed.mx
ORCID: 0000-0002-7182-7393
Graciela Zambrano-Galván: gzambrano@ujed.mx
ORCID: 0000-0003-4502-4017
Oscar Eduardo Almeda-Ojeda: oscar.almeda@ujed.mx
ORCID: 0000-0001-9885-1644
Norith de Jesús Recendez-Santillán: norith.recendez@gmail.com
ORCID: 0000-0002-7304-4149

Editora:

María Angélica Álvarez-Páucar
Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún tipo de conflictos de interés.

Fuente de financiamiento: autofinanciamiento.

Recibido: 21/07/21

Aceptado: 09/09/21

Publicado: 21/01/22

individuals had the diagnosis of cleft lip and palate at birth (75%), the extension of the complete affection (75%), the left side affected (63%), and corrective surgeries (62%). Only 4% were exposed to maternal smoking (active and passive), 96% had adequate folic acid and iron intake; the risk genotype for *TGFA* (rs3771494 [G/G]) was present in 15% of cleft lip and 8% of cleft lip and palate, and for *IFR6* (rs2235371 [T/T]) only in 10% of cleft lip and palate. **Conclusions.** The presence of environmental and genetic factors, as well as the maternal lifestyle shown in other populations, may not be the same as those involved in the appearance and development of non-syndromic orofacial clefts in our locality, in addition, the presence of homozygous polymorphic genotypes of the genes of interest could not condition the development of orofacial clefts.

Keywords: Cleft lip; Cleft palate; Polymorphism; Epidemiology (source: MeSH NLH).

Introducción

El labio y paladar hendido (LPH), conforman una de las afecciones congénitas más comunes de la región orofacial¹, representan un grupo heterogéneo de anomalías que comparten un mismo fenotipo caracterizado por una hendidura², y son resultado de una falta y falla de unión de los procesos faciales en la etapa embrionaria temprana que, dependiendo de la severidad, puede afectar la piel y músculos del labio superior e incluso originar deformidad nasal, así como afectar estructuras óseas del maxilar³. En general, la manifestación clínica del LPH puede ser unilateral o bilateral, así como completa o incompleta, y tales malformaciones se pueden clasificar anatómicamente como solo hendidura labial (SHL), solo hendidura de paladar (SHP) o una combinación de ambos (LPH)⁴, otra subclasificación toma en cuenta el origen embriológico del defecto, el cual puede afectar al paladar primario o al paladar secundario; del mismo modo la presencia o ausencia de alguna otra malformación de desarrollo determina su entidad, la cual puede ser sindrómica o no sindrómica⁵. Su prevalencia e incidencia está regida por la variación geográfica de los individuos, sin embargo, se puede establecer que a nivel mundial afecta a 1 por cada 700 nacimientos vivos aproximadamente⁴, siendo el sexo masculino el más afectado³. En México, la incidencia se presenta en 1 por cada 2000 nacimientos por año¹. Por otra parte, la prevalencia muestra una distribución heterogénea pues, del total de los casos de LPH, esta se ha reportado desde un 50%⁶, mostrando un 70%⁷, hasta alcanzar un 93-95% en su entidad no sindrómica⁸. Adicional a lo anterior, es importante mencionar que el LPH además de afectar la estética, tiene un impacto negativo y severo en la nutrición, la calidad de vida, la salud bucal, el desarrollo de habilidades y de lenguaje de quienes la padecen, situación que se agrava en la edad pediátrica por la implicación del desarrollo y crecimiento que, de no corregirse, se continúa en la etapa adulta⁹⁻¹².

La etiología de esta anomalía resulta compleja y multifactorial, sin embargo, se pueden señalar ciertos agentes causales, tal es el caso del factor ambiental, donde se han identificado factores de riesgo como el fumar, el consumo de alcohol, el uso de drogas o agentes teratógenos, o variaciones en el consumo dietario que, implicados en una exposición materna en etapas tempranas del

embarazo, condicionan la salud en ambos individuos, madre e hijo^{13,14}, además de esto, existe el componente genético que implica variaciones de genes y diversas vías moleculares¹⁵. En general, el desarrollo cráneo-facial se da como resultado de la interacción de diversos factores de transcripción y de diversas vías moleculares de señalización, y es cuando se presenta una disrupción en estos factores que se crea una susceptibilidad al desarrollo de hendiduras orofaciales (HO)¹⁶. Al momento, se ha identificado una vasta lista de genes candidatos, tanto en la entidad sindrómica como en la no sindrómica^{16,17}, y es en esta última entidad donde ha tomado relevancia la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido, a saber, el *rs3771494* en el Factor de crecimiento transformador Alfa (*TGFA*) y el *rs2235371* en el Factor regulador del interferón 6 (*IFR6*), genes codificantes de proteínas; dicha relevancia se da sobre todo por su contribución tanto de manera aislada como conjunta en el desarrollo de HO, esto, en diferentes poblaciones alrededor del mundo¹⁸.

Aun con las aproximaciones que se han dado entre la asociación de los factores genéticos y ambientales con la manifestación clínica del LPH, su etiología puntal no está del todo establecida, y esto puede ser resultado de la heterogeneidad característica de dicha anomalía orofacial y de la diversidad entre las poblaciones estudiadas¹¹. Actualmente, en nuestra localidad, no se cuenta con estudios que aborden esta afección o que describan los posibles componentes ambientales y genéticos de esta enfermedad, por lo cual el objetivo de esta investigación se centró en reportar el perfil epidemiológico y la presencia de polimorfismos de *IFR6* (rs2235371) y *TGFA* (rs3771494) en individuos con LPH no sindrómico.

Métodos

Este estudio, que contempla una serie de casos, fue realizado en individuos con diagnóstico de hendiduras orofaciales. La población de estudio consistió en individuos remitidos, y que acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad Juárez del Estado de Durango, México, para su revisión y valoración dentro del periodo comprendido entre enero del 2018 a diciembre del 2019. El tipo de muestreo fue no probabilístico y el tamaño de muestra se determinó por el número disponible de casos captados durante el periodo de estudio establecido, siendo este de 24 casos en total.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: participación voluntaria, firma de carta de consentimiento informado, cualquier sexo, con edad a partir del nacimiento y hasta los 18 años, individuos y sus madres quienes no hayan recibido transfusión sanguínea, individuos sin síndromes asociados (síndrome de Apert, síndrome de Crouzon, síndrome de DiGeorge, síndrome de Loey-Dietz, síndrome de Treacher Collins, síndrome del paladar hendido ligado al cromosoma X, anqui-loglosia, síndrome de Bamforth-Lazarus) y con diagnóstico establecido de HO no sindrómicas (Solo hendidura labial: SHL; Solo hendidura palatina: SHP; Labio y paladar hendido: LPH). Es importante mencionar que para el diagnóstico establecido de anomalías orofaciales de LPH no sindrómicas, se realizó lo siguiente: examen clínico exhaustivo; la realización de una historia médica completa que incluyó descripción de la hendidura, historia prenatal, historia de nacimiento, historia de desarrollo e historia familiar; exploración física que incluyó medición de peso, longitud o talla, identificación de anomalías de ojos, oídos, extremidades; evaluaciones radiológicas cuando se consideraron necesarias, lo anterior, realizado por parte de un médico de base de la Facultad de Odontología y de un especialista en cirugía oral y maxilofacial.

Aquellos quienes cumplieron con los criterios de inclusión, fueron analizados para determinar los genotipos correspondientes a polimorfismos de un solo nucleótido, dichos polimorfismos fueron el rs2235371 del gen *IFR6* y el rs3771494 del gen *TGFA*. Para la clasificación de las hendiduras orofaciales no sindrómicas, se tomó en cuenta la etiología embriológica y el fenotipo de la manifestación clínica, y se aplicó por medio de un especialista en cirugía oral y maxilofacial. A las madres, de los individuos incluidos con hendiduras orofaciales no sindrómicas, se les pregunto sobre sus hábitos durante los 3 primeros meses y durante todo el tiempo de gestación que incluían: fumar, consumir alcohol, uso de drogas o sustancias tóxicas, uso de medicamentos, ingesta de suplementos como ácido fólico, hierro y ácido retinoico; además, la edad al momento del embarazo y su duración, así mismo se indago sobre sus antecedentes heredofamiliares. El perfil epidemiológico de los individuos con hendiduras orofaciales incluyeron sexo, edad, lugar de nacimiento, enfermedades sistémicas, historia médica heredofamiliar, clasificación de la hendidura orofacial, peso y talla al nacer. Los datos fueron recabados a través de expedientes clínicos y por medio de un cuestionario con preguntas de interés para la investigación, aplicado por personal calificado en el área médica.

Recolección de muestras biológicas. A los individuos con diagnóstico de HO, se les indicó un ayuno de 8 hr previo a la toma de muestras. Se obtuvo muestra sanguínea mediante punción capilar del dedo índice, siguiendo las técnicas de asepsia y antisepsia. La punción se realizó con lanceta nueva y desechable para cada participante. Se recolectaron 10 microlitros de sangre capilar en tubos BD Vacutainer® con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), los cuales se colocaron en 100 microlitros de solución de lisis celular, en contenedores rotulados con

el folio de cada participante, el lisado resultante fue utilizado para realizar la tipificación de los polimorfismos de interés.

Genotipificación de los polimorfismos rs2235371 de IFG6 y rs3771494 de TGFA. El análisis de los polimorfismos se realizó por dos fases de amplificación del sitio polimórfico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tres pasos, seguido por el análisis de fundido de los productos de amplificación como se describe a continuación: la primera amplificación por PCR convencional de punto final utilizando GoTaq Master Mix (Promega Inc. Madison, WI), con el objetivo de obtener cantidades semejantes de productos de amplificación de cada una de las muestras. La mezcla de reacción para muestras de 15 microlitros fue: GoTaq Master Mix 7,5 microlitros; agua 5,7 microlitros; iniciador sentido 0,3 microlitros; iniciador antisentido 0,3 microlitros; lisado sanguíneo 1,2 microlitros.

Para la segunda amplificación se realizó utilizando PCR en tiempo real. La mezcla de reacción para cada muestra (15 microlitros) fue preparada de acuerdo con el manual de usuario que acompaña al reactivo Type it HRM (Qiagen Inc. Germantown, Maryland). Se utilizaron los siguientes iniciadores para ambas amplificaciones:

5'-AACGCTCTGGTCGTCATACACTGAATTTGTTAAGAATGGCAGATTT-3' (sentido),

5'-CACTATGAGAGCCTGCGTGGACGTTTTTGTAAAGAATGGCAGATTC-3' (antisentido).

Lo anterior para el polimorfismo rs3771494 (*A>G*) del gen *TGFA*; mientras que el análisis para el polimorfismo rs2235371 (*C>T*) del gen *IFR6* se realizó utilizando los iniciadores:

5'-CCTCATCAGTGGCTCTATCTGAACGTCCCGTCAGCCTGGAGCAGC-3' (sentido),

5'-GGATGAATCGCTTGGTGTACCTCATTCCTCCCGTCAGCCTGGAGCAGT-3' (antisentido).

Bajo las siguientes condiciones de amplificación: desnaturación (94 °C por 5 minutos), segunda desnaturación (95 °C por 45 segundos), alineación (58 °C por 45 segundos), extensión (77 °C por 45 segundos), repetición de paso 2, 3 y 4 (35 ciclos), y extensión final (72 °C por 5 minutos).

Finalmente, se realizó un análisis de curvas de fundido de ácido desoxirribonucleico (ADN) en un rango temperatura 55 a 90 °C. Las condiciones de la primera y segunda amplificación por PCR se establecieron de acuerdo a cada uno de los polimorfismos de los genes en estudio; para el análisis de las curvas de fundido se utilizó un termociclador Eco (Illumina. San Diego, CA) con canal para HRM (High Resolution Melting).

Consideraciones éticas. Este estudio conto con la aprobación del comité de ética del Hospital General 450 (Número de aprobación: 155), de igual manera se atendieron los lineamientos éticos de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, para protocolos de investigación en seres humanos y de la

NOM-004-SSA3-2012, para el uso y confidencialidad el expediente clínico.

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de normalidad, se aplicaron medidas de tendencia central y dispersión, porcentajes y análisis de independencia con la prueba exacta de Fisher, y Anova de un factor que permitieron describir los datos. Todo esto utilizando el paquete estadístico de libre distribución, R Studio¹⁹.

Resultados

En el periodo que comprendió el estudio, el total de casos incluidos y analizados fue de 24 individuos. En general, la manifestación clínica de las hendiduras orofaciales fue del 83,3% para LPH, 12,5% en SHL y del 4,2% para SHP. El LPH afectó al 75% del total de mujeres, mientras que del total de hombres el 87,5% presentó esta anomalía. Entre los individuos analizados se encontró una mediana de edad de 2 años, donde 67% fueron hombres, 79% tuvieron una edad menor a 5 años. El porcentaje de diagnósticos iniciales de HO que se realizaron en el momento del nacimiento fue del 75%. El lado que con mayor frecuencia fue afectado por estas hendiduras orofaciales fue el izquierdo con un 63%. La

extensión completa de LPH se presentó en el 75% de las afecciones, algunas otras características destacables se muestran en la tabla 1.

De acuerdo a la clasificación de hendiduras orofaciales, del total de mujeres, el riesgo de desnutrición al momento del nacimiento se presentó en el 12,5% y 25% de malformaciones orofaciales de SHL y LPH, respectivamente. Mientras que, del total de hombres, el riesgo de desnutrición se presentó en el 6,25% y 62,5% correspondientes a SHL y LPH, respectivamente. Por otra parte, el riesgo de baja estatura al momento del nacimiento se observó en el 12,5% y 25%, del total de mujeres, para SHL y LPH, respectivamente. Este riesgo de baja estatura en hombres afectó al 6,25% que presentó SHL y al 56,5% con LPH; a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas entre la clasificación de HO, se aprecia que es más afectado el tipo de LPH, como se puede apreciar en la tabla 2.

Dentro de las complicaciones generales en la salud de los individuos en estudio, ninguno presentó problemas cardiovasculares o auditivos, en la lengua, en su asimetría mandibular, en afecciones dermatológicas, afectación en extremidades superiores o inferiores ni en dedos de manos y pies; sin embargo, el 42% presentó retraso

Tabla 1. Características generales del total de individuos con diagnóstico de hendiduras orofaciales no sindrómicas

n=24 Variables		n (%)
Sexo	Hombres	16 (67%)
	Mujeres	8 (33%)
Edad actual (años)	Primera infancia (0-5)	19 (79%)
	Edad escolar (6-11)	2 (8%)
	Adolescencia (12-17)	3 (13%)
Tiempo de diagnóstico de HO	Durante el embarazo	5 (21%)
	Al nacer	18 (75%)
	Mayor a 1 año	1 (4%)
Talla	Al nacer (cm)	48,21 ± 4,21†
Peso	Al nacer (g)	2 938 ± 603,42†
Escolaridad	Sin escolaridad	19 (79%)
	Primaria	2 (8%)
	Secundaria	3 (13%)
Lado de hendidura	Izquierdo	15 (63%)
	Derecho	7 (29%)
	Bilateral	1 (4%)
	Central	1 (4%)
Extensión de hendidura	Incompleta	6 (25%)
	Completa	18 (75%)
Cirugías correctivas	Si	15 (62%)
	No	9 (38%)
Implicación embriológica	Paladar primario	23 (96%)
	Paladar secundario	1 (4%)

† Valores se muestran como media y desviación estándar. HO hendidura orofacial.

Tabla 2. Descripción de la talla y peso al nacer de acuerdo al sexo y clasificación de hendiduras orofaciales no sindrómicas

Mujeres n=8	Peso (g)	SHL n=2	LPH n=6	SHP n=0	P valor ‡
Riesgo de malnutrición	Menor a 2 800	1(12,5%)	2 (25%)	0 (0%)	0,67
Normal	3 200	0 (0%)	3 (37,5%)	0 (0%)	
Sobrepeso	Mayor a 3 700	1 (12,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)	
Obesidad	Mayor a 4 200	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Talla (cm)					
Riesgo de baja estatura	Menor a 47,0	1 (12,5%)	2 (25%)	0 (0%)	1,00
Normal	49,1	1 (12,5%)	4 (50%)	0 (0%)	
Hombres n=16	Peso (g)	SHL n=1	LPH n=14	SHP n=1	P valor ‡
Riesgo de malnutrición	Menor a 2 900	1 (6,25%)	10 (62,5%)	0 (0%)	0,26
Normal	3 300	0 (0%)	3 (18,75%)	0 (0%)	
Sobrepeso	Mayor a 3 900	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,25%)	
Obesidad	Mayor a 4 400	0 (0%)	1 (6,25%)	0 (0%)	
Talla (cm)					
Riesgo de baja estatura	Menor a 48,0	1 (6,25%)	9 (56,25%)	0 (0%)	0,62
Normal	49,9	0 (0%)	5 (31,25%)	1 (6,25%)	

SHL: Solo hendidura labial, LPH Labio y paladar hendido, SHP: Solo hendidura palatina.

‡ Prueba exacta de Fisher.

en el crecimiento, el 29% presentaron problemas de lenguaje y el 83% mostró algún signo de deformidad nasal.

Las características del curso del embarazo, de las madres de los individuos estudiados, de acuerdo a la clasificación de la manifestación de HO no muestra diferencias estadísticamente significativas, pero podemos destacar que el 12% de las manifestaciones de LPH fueron en mujeres que al momento del embarazo tenían edad menor a 19 años. El 96% tuvo una duración del embarazo normal (38-40 semanas), el 92% contó con al menos 3 citas de control prenatal. Del total de las madres, el 20% tuvo antecedentes familiares de cáncer, el 16% tuvo antecedentes familiares de diabetes y el 24% refirió antecedentes familiares de hipertensión, ver tabla 3.

Para los factores ambientales de interés con la exposición materna durante el primer trimestre de embarazo, destacamos que solo el 4% refirió haber fumado, el 16% indico haber utilizado antibióticos, el 4% el uso de ANES (anti-inflamatorios no esteroideos), y el 96% tuvo consumo de ácido fólico y hierro, ver tabla 4.

Por último, el genotipo homocigoto polimórfico (T/T) del gen *IFR6* se presentó en el 8% de las malformaciones orofaciales que corresponden a LPH, mientras que el genotipo homocigoto polimórfico (G/G) del gen *TGFA* se presentó en el 12% de las lesiones que correspondieron a SHL y LPH, la frecuencia del alelo polimórfico (*IFR6*-T, *TGFA*-G) en ambos genes fue del 48%, ver tabla 5.

Discusión

La ocurrencia de HO a nivel mundial se presenta en 1 por cada 700 nacimientos vivos ²⁰, mientras que en

diferentes regiones del mundo se presenta una prevalencia muy variada que va del 0,57 en África y hasta el 1,57 en Asia de casos de HO por cada 1000 nacimientos vivos ²¹. Es el LPH, la manifestación clínica de HO con mayor incidencia y prevalencia, esta última, representando hasta 3,4–22,9 por cada 10,000 nacimientos, a nivel mundial ²⁰. Es importante mencionar que la prevalencia de estas afecciones es heterogénea entre las diferentes poblaciones, dependiendo en gran medida de la región, la etnia, el método de reporte, el periodo de estudio y las condiciones económicas de los gobiernos ^{22,23}. En este estudio la mayor frecuencia de hendiduras orofaciales se presentó en la manifestación clínica de LPH con un 83,3% de los individuos analizados. Nuestro estudio mostró que fueron los hombres los más afectados por LPH (87,5%), el lado más afectado en afecciones unilaterales fue el izquierdo, lo que concuerda con lo descrito en la literatura ²⁰.

De las alteraciones en el desarrollo y crecimiento que pueden estar presentes con las HO destacan el bajo peso y la baja estatura del recién nacido, situación que se agrava en los primeros años de vida y que puede desencadenar una malnutrición si el defecto clínico no es corregido ²⁴; una alta frecuencia, hasta del 68%, de los recién nacidos con HO presentan malnutrición ²⁵, y en general un crecimiento y desarrollo deficiente se puede observar en los individuos que son afectados con estas anomalías orofaciales ²⁶. Para nuestros casos estudiados, la manifestación clínica de LPH mostro estar más relacionado con el riesgo de bajo peso (25%) y con el riesgo de baja estatura de las mujeres (25%), mientras que en hombres fue del 62,5% y 56,25%, respectivamente.

Tabla 3. Características del embarazo de acuerdo al tipo de hendiduras orofaciales no sindrómicas

		SHL n=3	LPH n=20	SHP n=1	P valor
Edad de la madre	Media ± DE	31,33 ± 6,50	24,35 ± 4,6	23 ± 0	0,66 ≠
Edad de embarazo	Menor o igual a 9	0 (0%)	3 (15%)	0 (0%)	0,30 ‡
	De 20 a 34	2 (66,7%)	17(85%)	1 (100%)	
	Mayor o igual a 35	1 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	
Duración de embarazo (semanas)	Menor a 37	1 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0,16 ‡
	38-40	2 (66,7%)	20 (100%)	1 (100%)	
Numero de citas prenatales	Ninguna	1 (33,3%)	1 (5%)	0 (0%)	0,63 ‡
	3-6	0 (0%)	2 (10%)	0 (0%)	
	7-9	2 (66,7%)	16 (80%)	1 (100%)	
	10-12	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	
Complicaciones durante embarazo	Si	2 (66,7%)	3 (15%)	0 (0%)	0,17 ‡
	No	1 (33,3%)	17 (85%)	1 (100%)	
Tipo de nacimiento	Parto natural	0 (0%)	11 (55%)	1 (100%)	0,21 ‡
	Cesárea programada	3 (100%)	9 (45%)	0 (0%)	
Complicaciones durante el parto	Si	2 (66,7%)	2 (10%)	0 (0%)	0,11 ‡
	No	1 (33,3%)	18 (90%)	1 (100%)	
Historia familiar (de la madre)	Cáncer				0,17 ‡
	Si	2 (66,7%)	3 (15%)	0 (0%)	
	No	1 (33,3%)	17 (75%)	1 (100%)	
	Diabetes				1,0 ‡
	Si	0 (0%)	4 (20%)	0 (0%)	
	No	3 (100%)	16 (80%)	1 (100%)	
Hipertensión				0,25 ‡	
Si	2 (66,7%)	4 (20%)	0 (0%)		
No	1 (33,3%)	16 (80%)	1 (100%)		

SHL: Solo hendidura labial, LPH: Labio y paladar hendido, SHP: Solo hendidura palatina.

DE: Desviación estándar, ‡ Prueba exacta de Fisher; ≠ Prueba ANOVA de un factor.

Tabla 4. Factores ambientales de exposición materna en el primer trimestre de gestación según el tipo de hendiduras orofaciales no sindrómicas

Exposiciones maternas en primer trimestre	SHL	LPH	SHP	Total n (%)
Fumador	1	0	0	1 (4%)
Fumador pasivo	1	0	0	1 (4%)
Consumo de alcohol	0	0	0	0 (0%)
Uso de drogas ilícitas	0	0	0	0 (0%)
Uso de antibióticos	1	3	0	4 (16%)
Uso de AINES	0	1	0	1 (4%)
Ingesta de hierro	3	19	1	23 (96%)
Ingesta de ácido retinoico	0	0	0	0 (0%)
Ingesta de multivitamínicos	0	0	0	0 (0%)

SHL: Solo hendidura labial, LPH: Labio y paladar hendido, SHP: Solo hendidura palatina. AINES: Anti-inflamatorios no esteroideos.

Tabla 5. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de rs2235371 del gen *IRF6* y de rs3771494 del gen *TGFA* en hendiduras orofaciales no sindrómicas

<i>IRF6</i> rs2235371	Total n= 24	SHL	LPH	SHP	
Genotipo					P valor †
CC	3 (13%)	0 (0%)	3 (15%)	0 (0%)	
CT	19 (79%)	3 (100%)	15 (75%)	1 (100%)	
TT	2 (8%)	0 (0%)	2 (10%)	0 (0%)	
alelo					0,86
C	25 (52%)	3 (50%)	21 (53%)	1 (50%)	
T	23 (48%)	3 (50%)	19 (47%)	1 (50%)	
HWE					0,10
<i>TGFA</i> rs3771494	Total n= 24	SHL	LPH	SHP	
Genotipo					P valor †
AA	4 (16%)	0 (0%)	4 (16%)	0 (0%)	
AG	17 (72%)	2 (75%)	14 (76%)	1 (100%)	
GG	3 (12%)	1 (15%)	2 (8%)	0 (0%)	
alelo					0,69
A	25 (52%)	2 (33%)	22 (55%)	1 (50%)	
G	23 (48%)	4 (67%)	18 (45%)	1 (50%)	
HWE					0,33

Genotipos de riesgo (rs2235371-T/T), (rs3771494-G/G). † Prueba Ji²; SHL: Solo hendidura labial, LPH: Labio y paladar hendido, SHP: Solo hendidura palatina. HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg

Los individuos con HO, tienen mayor riesgo a presentar déficit y trastornos de desarrollo neurológicos²⁷⁻²⁹. Algo que también estuvo presente en nuestros resultados pues se presentó un 29% de problemas de desarrollo y un 83% de problemas de lenguaje entre los individuos con HO.

Además de lo anterior, diferentes estudios han identificado alteraciones en diversos órganos y sistemas como el musculo esquelético, cardiaco y nervioso, así como malformación de estructuras que complementan la zona facial como asimetrías, problemas auditivos, deformaciones nasales e incluso disfunciones articulares mandibulares, por mencionar algunos³⁰⁻³², siendo las afecciones cardiacas las que tienen mayor relevancia clínica y quirúrgica en presencia de HO³³⁻³⁵. Sin embargo, ninguna de las alteraciones sistémicas y afecciones de interés se presentó en este estudio, solo llama la atención un alto porcentaje de deformaciones nasales en la población estudiada, algo que tiene relación con el alcance de afectación que pueden presentar las HO.

Actualmente, la etiología de las HO sugiere y acepta un origen multifactorial complejo, su causalidad se atribuye principalmente a los factores genético y ambiental¹⁵, por otra parte, se han estudiado y señalado una serie de factores de riesgo asociados al desarrollo de HO de los cuales se destacan una edad de embarazo mayor a 35 años, una duración del embarazo menor a 37 semanas, la implementación de cesáreas, el bajo número de

citadas prenatales³⁶, así como la presencia de antecedentes familiares de enfermedades que pueden influir en el desarrollo y presencia de anomalías y un sin número de afecciones³⁷. En el presente estudio, la edad al momento del embarazo mayor o igual a 35 años solo tuvo relación con el 33,3% de los individuos con SHL, de igual forma la duración del embarazo menor a 37 semanas solo se presentó en el 33,3% de SHL, mientras que el no tener citas prenatales solo se presentó en el 33,3% de SHL y en el 5% de LPH, además, la cesárea estuvo indicada en el 100% de las madres de individuos con SHL y en el 45% de madres de individuos con LPH, por último, para el historial familiar fueron las enfermedades de cáncer e hipertensión las que se reportaron en el 66,7% de madres de individuos con SHL; y solo el 15%, 20% y 20% de cáncer, diabetes e hipertensión se reportaron como historial en madres e individuos con LPH, respectivamente.

Está bien establecido que el estilo de vida y algunos hábitos maternos son perjudiciales en el embarazo, tanto en el primer trimestre como en el transcurso completo, y pueden incrementar el riesgo de desarrollar algún tipo de HO^{12,14}, al respecto, el tabaquismo, alcoholismo, el uso de drogas o medicamentos, el no tomar ácido fólico, hierro, y el consumir vitaminas han sido relacionados y asociados fuertemente y de manera causal al desarrollo de HO^{13,38,39}. En contraste a lo anterior, este estudio muestra que el 96% del total de las madres de

individuos con HO tuvo una adecuada ingesta de ácido fólico y de hierro, ninguna ingirió algún tipo de suplemento vitamínico, y solo el 4% manifestó haber tenido exposición al tabaco, de manera activa o pasiva además, ninguna refirió haber consumido alcohol, mientras que en el consumo de medicamentos el uso de antibióticos y antiinflamatorios no esteroideos se presentó en el 16% y 4%, respectivamente, todo lo anterior durante el primer trimestre de gestación.

Dentro de las frecuencias alélicas y genotípicas correspondientes al gen *TGFA* (rs3771494), a nivel mundial se encuentra un 63,4%[A] y 36,6%[G], para los genotipos se tiene un 43,5%[A/A], 39,8%[A/G] y 16,7%[G/G]⁴⁰. Mientras que, para México, las frecuencias son 47,7%[A] y 52,3%[G]; las genotípicas de 29,7%[A/A], 35,9%[A/G] y 34,4%[G/G]⁴⁰. Lo anterior contrasta con los resultados de este estudio (Tabla 5), pero atribuimos dichas diferencias al tamaño de muestra analizado.

Por otro lado, para estas frecuencias en el gen *IRF6* (rs2235371), a nivel mundial se tiene un 86,7%[C] y 13,3%[T], para los genotipos se tiene un: 78,4%[C/C], 16,6%[C/T] y 5%[T/T]⁴¹. Mientras que, para México, las frecuencias se establecen en 81,2%[C] y 18,8%[T]; las genotípicas de 70,3%[C/C], 21,9%[C/T] y 7,8%[T/T]⁴¹. Algo que también discrepa de los resultados obtenidos en este estudio, considerando al tamaño de muestra como principal causa.

Se han realizado investigaciones que sugieren una mayor asociación de los genes *TGFA* e *IRF6*, cuando se encuentran presentes de manera simultánea, y la presencia de HO^{18,42}. Al respecto, Lu *et al.*⁴³ indican que la distribución de los genotipos en rs3771494, tienen fuerte asociación con el labio hendido con o sin paladar hendido (T/C: OR=1,601; IC 95%= 1,122-2,286; p= 0,009. C/C: OR= 3,568; IC 95%= 1,94-6,564; p= 0,000. T/C+C/C: OR= 1,886; IC 95%= 1,356-2,624; p= 0,000; variante 1 de la transcripción de *TGFA*:T/C); y para la distribución de los genotipos en rs2235371, encontraron a la par una asociación con el labio hendido con o sin paladar hendido (C/T: OR= 0,664, IC 95%=0,471-0,937, p=0,02; T/T: OR= 0,33, IC 95%= 0,18-0,584, p= 0,000; C/T+T/T: OR= 0,618, IC 95%= 0,448-0,852, p= 0,003), en su estudio de casos y controles para una población China.

Por su parte, Letra *et al.*⁴² mencionan una asociación entre los genotipos de riesgo de rs2235371 (T/T) y el alelo de riesgo (T) y la presencia de labio y paladar hendido completo en lado izquierdo (p= 0,0002 y p= 0,00001, respectivamente), así como una asociación entre el labio y paladar hendido de afección incompleta y el alelo de riesgo (T), p= 0,003, tras realizar su estudio en población caucásica brasileña.

Podemos agregar que dentro de la etiología multifactorial de las HO, actualmente existen estudios que ha extendido una relación importante con una vasta lista de genes, variaciones y polimorfismos de un solo nucleótido⁴⁴, de la cual el gen *FOXE1* representa una conexión destacable como así lo demuestran una serie de estudios

⁴⁵⁻⁴⁸, dicha conexión toma relevancia al exponer que este gen está directamente implicado en el desarrollo y crecimiento embrionario, así como de la glándula tiroidea, más aun, cuando dicha glándula puede ser afectada por la presencia de concentraciones elevadas de flúor, elemento considerado como disruptor tiroideo; es de sumo interés mencionar que los casos analizados radican en una zona con altos niveles de flúor que sobrepasan los límites permisibles establecidos por las normas oficiales mexicanas en el agua para consumo humano y en general en los pozos de agua destinados para satisfacer las necesidades de la población⁴⁹, por lo que se puede sugerir que la presencia de HO podría estar relacionada a la presencia de este disruptor y la acción de otros genes y factores de transcripción con acción en la etapa embrionaria que merecen un estudio dirigido.

Finalmente, consideramos que las limitantes del estudio son sin duda el reducido número de casos estudiados y el periodo de captación de los mismos; claramente no podemos extrapolar nuestros resultados a la población general, sin embargo, consideramos relevante y de suma importancia este estudio ya que permite una aproximación epidemiológica hasta el momento ausente en nuestra región además, puede ser utilizado como referente para futuras investigaciones que puedan llevarse a cabo en nuestra comunidad, con lo cual se estaría coadyuvando en el estudio y entendimiento de estas afecciones orofaciales.

Los hallazgos de este estudio, sugieren que la presencia de factores ambientales, genéticos, así como el estilo de vida materno mostrado en otras poblaciones, podrían no ser los mismos que se encuentren presentes en la aparición y desarrollo de las HO no sindrómicas de nuestra localidad, además, la presencia de los genotipos homocigotos polimórficos de los genes de interés podría no condicionar del todo el desarrollo de HO, se requieren más estudios al respecto a fin de ampliar estas conclusiones.

Agradecimiento

Los autores agradecen la colaboración y atención mostrada por parte de la Fundación Garza Limón y de la organización Smile Train Latinoamérica por la información y remisión de personas interesadas, y del mismo modo agradecen a la Facultad de Odontología de la Universidad Juárez del Estado de Durango por la facilidad de sus instalaciones.

Referencias bibliográficas

1. Picazo JP, Rodríguez Gallegos MF. Labio y Paladar Hendido. Conceptos Actuales. Acta Médica Grupo Ángeles. 2019;17(4):372-379.
2. Voigt A, Radlanski RJ, Sarioglu N, Schmidt G. Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten [Cleft Lip And Palate]. Pathologie. 2017;38(4):241-247. DOI:10.1007/S00292-017-0313-X
3. Chadha A, Cobb ARM. Development Of Cleft Lip And Palate. En: Carachi R, Doss S, editores. Clinical Embryology. Springer, Cham; 2019.p. 111-118. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26158-4_13

4. Candotto V, Oberti L, Gabrione F, Greco G, Rossi D, Romano M, Mummolo S. Current Concepts On Cleft Lip And Palate Etiology. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2019;33(3 Suppl. 1):145–151.
5. Wilson-Nagrani C, Richmond S, Paternoster L. Non-Syndromic Cleft Lip And Palate Polymorphisms Affect Normal Lip Morphology. *Front Genet.* 2018;24(9):413. DOI: 10.3389/Fgene.2018.00413.
6. Martinelli M, Palmieri A, Carinci F, Scapoli L. Non-syndromic Cleft Palate: An Overview on Human Genetic and Environmental Risk Factors. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:592271. DOI: 10.3389/fcell.2020.592271
7. Auslander A, McKean-Cowdin R, Feigelson D, et al. The International Family Study of Nonsyndromic Orofacial Clefts: Design and Methods. *Cleft Palate Craniofac J.* 2021;10556656211018956. DOI:10.1177/10556656211018956
8. Stuppia L, Capogreco M, Marzo G, La Rovere D, Antonucci I, Gatta V, Palka G, Mortellaro C, Tetè S. Genetics Of Syndromic And Nonsyndromic Cleft Lip And Palate. *J Craniofac Surg.* 2011;22(5):1722-6. DOI: 10.1097/Scs.0b013e31822e5e4d.
9. Silva MARD, Balderrama IF, Wobeto AP, Werneck RI, Azevedo-Alanis LR. The impact of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on oral health-related quality of life. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170145. DOI: 10.1590/1678-7757-2017-0145.
10. Cavalheiro MG, Lamônica DAC, de Vasconcelos Hage SR, Maximino LP. Child development skills and language in toddlers with cleft lip and palate. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2019;116:18-21. DOI:10.1016/j.ijporl.2018.10.011
11. Van Dyck J, Cadenas de Llano-Pérula M, Willems G, Verdonck A. Dental development in cleft lip and palate patients: A systematic review. *Forensic Sci Int.* 2019;300:63-74. DOI:10.1016/j.forsciint.2019.04.011
12. Raghavan U, Vijayadev V, Rao D, Ullas G. Postoperative Management of Cleft Lip and Palate Surgery. *Facial Plast Surg.* 2018;34(6):605-611. DOI:10.1055/s-0038-167638111.
13. Honein MA, Rasmussen SA, Reefhuis J, Romitti PA, Lammer EJ, Sun L, Correa A. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiol.* 2007;18(2):226-33. DOI: 10.1097/01.ede.0000254430.61294.c0.
14. Lu C, Wang JY, Jia ZL. [Environmental factors of non-syndromic cleft lip and palate]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2019;37(5):547-550. Chinese DOI: 10.7518/hxkq.2019.05.018.
15. Deshpande AS, Goudy SL. Cellular and molecular mechanisms of cleft palate development. *Laryngoscope Invest Otolaryngol.* 2018;4(1):160-164. DOI:10.1002/liv.2.214
16. Oboli GO, Chukwuma DI, Fagbule OF, Abe EO, Adisa AO. Molecular Genetics Of Cleft Lip And Palate: A Review. *Ann Ib Postgrad Med.* 2020;18(1):S16-S21.
17. Saleem K, Zaib T, Sun W, Fu S. Assessment of candidate genes and genetic heterogeneity in human non syndromic orofacial clefts specifically non syndromic cleft lip with or without palate. *Heliyon.* 2019;5(12):e03019 DOI:10.1016/J.Heliyon.2019.E03019
18. Khan AMI, Prashanth C S, Srinath N. Genetic Etiology Of Cleft Lip And Cleft Palate [J]. *AIMS Molecular Science.*2020;7(4):328-348.
19. R Core Team. R: A Language And Environment For Statistical Computing. R Foundation For Statistical Computing, Vienna, Austria. 2019. [Citado 1 de Marzo 2021]. Disponible en: <https://www.R-Project.Org/>
20. Ahmed M K, Bui AH, Taioli E. Epidemiology Of Cleft Lip And Palate. In *Designing Strategies For Cleft Lip And Palate Care.* Intechopen. 2017.
21. Panamonta V, Pradubwong S, Panamonta M, Chowchuen B. Global Birth Prevalence Of Orofacial Clefts: A Systematic Review. *J Med Assoc Thai.* 2015;98(Suppl 7):S11-21.
22. Wang M, Yuan Y, Wang Z, Liu D, Wang Z, Sun F, et al. Prevalence Of Orofacial Clefts Among Live Births In China: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Birth Defects Res.* 2017;109(13):1011-1019. DOI: 10.1002/Bdr2.1043
23. Kadir A, Mossey PA, Blencowe H, et al. Systematic Review and Meta-Analysis of the Birth Prevalence of Orofacial Clefts in Low- and Middle-Income Countries. *Cleft Palate Craniofac J.* 2017;54(5):571-581. DOI:10.1597/15-221
24. Abdollahi-Fakhim, Sh, Bayazian Gh, Shiva S, Sohrabpour M, Ebrahimzade Y. Growth hormone deficiency in cleft lip and palate patients. *J. Clin. Med. Res.* 2015;3(4):231-235. DOI: 10.15171/jarcm.2015036
25. Tungotyo M, Atwine D, Nanjebe D, Hodges A, Situma M. The prevalence and factors associated with malnutrition among infants with cleft palate and/or lip at a hospital in Uganda: a cross-sectional study. *BMC Pediatr.* 2017;17(1):17. DOI:10.1186/s12887-016-0775-7
26. Miranda GS, Marques IL, de Barros SP, Arena EP, de Souza L. Weight, Length, and Body Mass Index Growth of Children Under 2 Years of Age With Cleft Lip and Palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2016;53(3):264-271. DOI:10.1597/14-003
27. Tillman KK, Hakelius M, Höijer J, et al. Increased Risk for Neurodevelopmental Disorders in Children With Orofacial Clefts. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2018;57(11):876-883. DOI:10.1016/j.jaac.2018.06.024
28. Gallagher ER, Collett BR. Neurodevelopmental and Academic Outcomes in Children With Orofacial Clefts: A Systematic Review. *Pediatrics.* 2019;144(1):e20184027. DOI:10.1542/peds.2018-4027
29. Wehby GL, Cassell Ch. The Impact Of Orofacial Clefts On Quality Of Life And Healthcare Use And Costs. *Oral Dis.* 2010;16(1):3-10. DOI:10.1111/J.1601-0825.2009.01588.X
30. Pereira AV, Fradinho N, Carmo S, et al. Associated Malformations in Children with Orofacial Clefts in Portugal: A 31-Year Study. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2018;6(2):e1635. DOI:10.1097/GOX.0000000000001635

31. Silva HPVD, Arruda TTS, Souza KSC, et al. Risk factors and comorbidities in Brazilian patients with orofacial clefts. *Braz Oral Res.* 2018;32:e24. DOI:10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0024
32. Silva FCD, Oliveira TM, Almeida ALPF, Bastos RDS, Neppelenbroek KH, Soares S. Impact of Temporomandibular Disorders and Sleep Bruxism on Oral Health-Related Quality of Life of Individuals With Complete Cleft Lip and Palate. *J Craniofac Surg.* 2018;29(6):1505-1508. DOI:10.1097/SCS.0000000000004723
33. Asani MO, Aliyu I. Pattern Of Congenital Heart Defects Among Children With Orofacial Clefts In Northern Nigeria. *J Cleft Lip Palate Craniofac Anomal.* 2014;1:85-7. DOI: 10.4103/2348-2125.137895
34. Benjamin IA, Akinwale AE, Helen OA, Rafael AA. Congenital Heart Disease In Cleft Lip And Palate Patients: How Common Is The Association?. *J Adv Oral Res.* 2017;8(1-2):53-56.
35. Lethaus B, Grau E, Kloss-Brandstätter A, et al. Clinical Follow-Up in Orofacial Clefts-Why Multidisciplinary Care Is the Key. *J Clin Med.* 2021;10(4):842. DOI:10.3390/jcm10040842
36. Shibukawa BMC, Rissi GP, Higarashi IH, Oliveira RRD. Factors Associated With The Presence Of Cleft Lip And / Or Cleft Palate In Brazilian Newborns. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant.* 2020;19:947-956.
37. Genetic Alliance. Cómo entender la genética: Una guía para pacientes y profesionales médicos en la región de Nueva York y el Atlántico Medio. *Como Entender La Genética*, 117. Washington (DC): Genetic Alliance, 2009.
38. Angulo-Castro E, Acosta-Alfaro Lf, Guadron-Llanos A, et al. Maternal Risk Factors Associated With The Development Of Cleft Lip And Cleft Palate In Mexico: A Case-Control Study. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2017;29(93):189-195.
39. Martelli DR, Coletta RD, Oliveira EA, et al. Association between maternal smoking, gender, and cleft lip and palate. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2015;81(5):514-519. DOI:10.1016/j.bjorl.2015.07.011
40. Genecards. [Internet]. Weizmann Institute Of Science; 2021 [Actualizado 14 Feb 2013; Citado 1 de Marzo 2021]. Disponible en: <https://www.genecards.org/Cgi-Bin/Carddisp.Pl?Gene=Tgfa>
41. Genecards. [Internet]. Weizmann Institute Of Science; 2021 [Actualizado 14 Feb 2013; Citado 1 de Marzo 2021]. Disponible en: <https://www.genecards.org/Cgi-Bin/Carddisp.Pl?Gene=Irf6&Keywords=Irf6>
42. 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(9):e45441. DOI:10.1371/journal.pone.0045441
43. Lu Y, Liu Q, Xu W, et al. TGFA and IRF6 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in northeast China [published correction appears in *PLoS One.* 2014;9(12):e116257]. *PLoS One.* 2013;8(8):e70754. DOI:10.1371/journal.pone.0070754
44. Reynolds K, Zhang S, Sun B, Garland MA, Ji Y, Zhou CJ. Genetics and signaling mechanisms of orofacial clefts. *Birth Defects Res.* 2020;112(19):1588-1634. DOI:10.1002/bdr2.1754
45. Xiao WL, Jia KN, Yu G, Zhao N. Association between forkhead box E1 polymorphisms and risk of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: A meta-analysis. *Orthod Craniofac Res.* 2020;23(2):151-159. DOI:10.1111/ocr.12366
46. Leslie EJ, Carlson JC, Shaffer JR et al. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic orofacial clefts identify novel associations between FOXE1 and all orofacial clefts, and TP63 and cleft lip with or without cleft palate. *Hum Genet.* 2017;136:275-286. DOI: 10.1007/s00439-016-1754-7
47. Xie L, Deng Y, Yuan Y, Tan X, Liu L, Li N & Dai L. Association of SNP rs1867277 in FOXE1 Gene and Cleft Lip with or without Cleft Palate in a Han Chinese Population. *Fetal Pediatr Pathol.* 2018;37(2):89-94.
48. Ludwig KU, Böhmer AC, Rubini M, et al. Strong association of variants around FOXE1 and orofacial clefting. *J Dent Res.* 2014;93(4):376-381. DOI:10.1177/0022034514523987
49. Molina Frechero N, Sánchez Pérez L, Castañeda Castañeira E, et al. Drinking water fluoride levels for a city in northern Mexico (durango) determined using a direct electrochemical method and their potential effects on oral health. *Scientific World Journal.* 2013;2013:186392. DOI:10.1155/2013/186392