

Ernesto Daniel Bracamonte Gómez

**Polimorfismos mais comuns associados ao aparecimento de Fissuras Labiopalatinas não  
sindrómicas.**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2020



Ernesto Daniel Bracamonte Gómez

**Polimorfismos mais comuns associados ao aparecimento de Fissuras Labiopalatinas não  
sindrómicas.**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2020

Ernesto Daniel Bracamonte Gómez

**Polimorfismos mais comuns associados ao aparecimento de Fissuras Labiopalatinas não  
sindrómicas.**

Trabalho apresentado à Universidade  
Fernando Pessoa como parte dos requisitos  
para obtenção

do grau de Mestre em Medicina Dentária.

---

(Ernesto Daniel Bracamonte Gómez)

## RESUMO

As Fissuras Labio Palatinas não sindrômicas (FLPns) são as malformações craniofaciais com maior incidência na população mundial e têm uma forte componente genética e ambiental. Os estudos da genética da era do GWAS têm conseguido relacionar diversos polimorfismos com o aparecimento de FLPns. Contudo, persiste alguma controvérsia, devido a alguns resultados contraditórios possivelmente associados a variações populacionais e/ou estudos em populações com várias patologias agrupadas.

O objetivo desta revisão bibliográfica foi identificar os polimorfismos de nucleótido único (SNP) mais frequentemente associados ao aparecimento das FLPns. Foi realizada uma pesquisa através da base de dados da Pubmed e Science Direct, onde foram encontrados 45 artigos nos últimos 5 anos e analisados os SNP aí evidenciados. Os polimorfismos rs2235371, rs12532, rs6446693, rs642961, rs17563 e rs2268625 foram os mais citados por diversos autores em populações da Ásia, Europa, América Latina e Medio Oriente. Estudos em modelos animais têm também identificado vários SNP e cuja associação a FLPns foi posteriormente confirmada no Homem.

Pode-se então concluir que, devido ao processo complexo de desenvolvimento craniofacial mediado e coordenado por uma multitude de genes, é preciso entender o funcionamento dos mesmos, bem como a relação entre si, para assim compreender os fatores que podem ou não influenciar o aparecimento de FLPns. No entanto, são necessários mais estudos para esclarecer as discrepâncias entre os vários autores.

**Palavras-chave:** Polimorfismo; mutação; fissura labial; fissura do palato; não sindrômicas.

## **ABSTRACT**

Non-syndromic cleft lip and palatal (NsCLP) are the craniofacial malformations with the highest incidence in global populations which have a strong genetic and environmental component. Genome-wide association studies (GWAS) have shown an association between some SNP's and NsCLP. However some controversy remains fuelled by contradictory results possibly associated with population diversity and/or studies with mixed pathology patients.

The present work aims at identify and discuss the most often found NsCLP associated SNP's in papers referenced in Pubmed and Science Direct bibliographic and published in the last 5 years. SNP's rs2235371, rs12532, rs6446693, rs642961, rs17563 and rs2268625 were identified as the most often identified associated with Human NsCLP in Asian, European, Latin-American and Meddle East populations. Animal models have also provided several SNP influencing cranio-maxilar development and some of these have been also found associated to Human NsCLP.

In conclusion, due to the complex process of the craniofacial development mediated and coordinated by multiple genes, it is mandatory to understand the functioning and relationship between them to thoroughly discern wish are the factors that could influence in the NsCLP development. However more studies are needed to clarify the discrepancies sometimes observed between studies.

**Keywords:** Polimorphism; mutation; cleftlip; cleftpalate; nonsyndromic.

## **DEDICATORIAS**

A minha esposa Priscila Boletini Bracamonte e meus pais Ernesto Bracamonte Teran e Aixa Janet Gomez Campos sem voces nada de esto seria possivel.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor doctor Jose Cabeda por guiar-me pelo interessante mundo da genetica.



## Índice geral

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
DEDICATORIAS .....	vii
AGRADECIMENTOS .....	viii
ÍNDICE DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
I. Introdução .....	1
1.1 Genética da embriologia craniofacial:.....	1
1.2 Definição de fissuras labiopalatinas:.....	3
1.3 Classificação das fissuras labiopalatinas.....	4
1.4 Epidemiologia e distribuição das fissuras labiopalatinas .....	4
1.5 Fatores de risco para o aparecimento das Fissuras labiopalatinas.....	5
1.6 Objetivo da revisão bibliográfica .....	5
II. Materiais e Métodos:.....	5
III. Resultados .....	6
IV. Discussão.....	7
4.1 Polimorfismos em IRF6 .....	7
4.2 Polimorfismos em MSX1 .....	10
4.3 Polimorfismo em BMP4: .....	12
4.4 Polimorfismo em TGF $\beta$ 3: .....	13
V. Conclusão .....	14
VI. Bibliografia .....	16

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela I:</b> SNP de genes que influenciam a morfologia facial .....	2
---	---

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

BMP- Proteína morfogénica óssea (do inglês Bone morphogenetic protein)

FL- Fissura labial sem fissura palatina

FP – Fissura do palato posterior sem fissura labial

FLcP- Fissura labial com fissura palatina

FLP – Fissura Labiopalatina

FL/P- Fissura labial com ou sem fissura palatina

FLPns- Fissura labiopalatina não síndrómica

FLPs-Fissura labiopalatina síndrómica

GWAS – Estudo de associação em todo o genoma (do inglês Genome Wide Association Study)

LD- Desequilíbrio de ligação (do inglês Linkage-disequilibrium)

MAF- Frequência alélica menor (do inglês minor allele frequency)

NsCLP- Non-syndromic clefts lip and palatal

SNP- Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês single nucleotide polymorphism)

## I. Introdução

### 1.1 Genética da embriologia craniofacial:

O rosto humano é um complexo anatômico altamente variável e com uma forte componente hereditária. É composto por estruturas que em conjunto, fazem cada pessoa única, distinguível e reconhecível (Weinberg, 2014; Cole *et al.*, 2016; Shaffer *et al.*, 2016).

O desenvolvimento craniofacial é um processo complexo modulado pela expressão de múltiplos genes embrionários cronometrados no tempo e no espaço, atuando em sintonia com fatores de transcrição, moléculas sinalizadoras, hormonas e fatores biomecânicos (Claes *et al.*, 2014; Cesario *et al.*, 2017), embora a forma como esses genes interagem ainda não seja totalmente compreendida (Som, Streit and Naidich, 2014).

Estudos familiares em medicina e genética clínica têm sido fundamentais para estabelecer a nossa compreensão dos genes que afetam a variabilidade craniofacial. O estudo desses genes, clinicamente relevantes na busca de evidências significativas na determinação da variação fenotípica, é um campo promissor na investigação genética, destacando-se os estudos realizados em gêmeos e em animais (Twigg and Wilkie, 2015). Como resultado do avanço das tecnologias de genotipagem, grandes projetos têm sido realizados, como por exemplo o projeto do genoma humano (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), *Hapmap* (The International HapMap Consortium, 2003), assim como avanços na genética estatística que permitiram que diversos estudos de associação de todo o genoma (GWAS) descobrissem variantes genéticas em populações para posterior associação a diferentes patologias.

Rooseboom *et al.* realizou em 2016 uma revisão bibliográfica onde incluiu múltiplos estudos sobre genes e alelos que afetam os padrões de desenvolvimento craniofacial (tabela 1) e, dos genes que mais relevância apresentaram, destacam-se os do grupo *Paired Box* (PAX), em especial PAX1, PAX3 e PAX9, relacionados com o desenvolvimento da largura facial (exemplo a largura da base craniana e a distância entre os olhos) (Roosenboom *et al.*, 2016).

Os genes da família PAX codificam um importante fator de transcrição expresso nas células da crista neural, que contribuem para a diferenciação da maioria dos tipos celulares na face dos seres vertebrados (Liu *et al.*, 2012). O gene PAX3 tem demonstrado

afetar significativamente a média típica da largura da ponte nasal (Claes and Shriver, 2016), enquanto que os genes PAX1 e PAX9 estão diretamente relacionados com a largura da base nasal, base do crânio e gênese dental (Adhikari *et al.*, 2016; Shaffer *et al.*, 2016) (tabela 1).

**Tabela I:** SNP de genes que influenciam a morfologia facial, de acordo com publicações de diferentes GWAS (*Adaptado de Roosenboom et al., 2016*)

Publicação	Gene	SNP	Efeito
<i>Paternosteret al., 2012</i>	PAX3	rs7559271	Distância nasio-intercantal média.
<i>Liuet al., 2012</i>	PRDM16	rs4648379	Largura e altura do nariz
	PAX3	rs168686344 rs12694574 rs974448	Distância entre os globos oculares e o nasio
	TPG3	rs17447439	Distância entre os globos oculares
	C5ORF50	rs6555969	Posição do nasio
	CO17A1	rs805722	Distância entre os globos oculares e o nasio
<i>Adhikariet al., 2016</i>	DCHS2	rs12644248	Inclinação da columela
	RUNX2	rs1852985	Largura da ponte do nariz
	GLI3	rs17660804	Largura da asa do nariz
	PAX1	rs927833	Largura da asa do nariz
	EDAR	rs3827760	Protrusão do queixo
<i>Shafferetall., 2016</i>	MAF	rs6129564	Largura da base craniana
	PAX9	rs17106852	Largura da base craniana
	MIPOL1	rs17106852	Largura da base craniana
	ALX3	rs619686	Largura da base intercantal
	HDAC8	rs11093404	Largura da base intercantal
	PAX1	rs2424399	Largura nasal
<i>Cole et al., 2016</i>	SCHIP1	rs79909949	Tamanho do cetróide
	PDE8A	rs12909111 rs12908400	Alometria

Outro gene importante no desenvolvimento da crista neural é o da proteína morfogénica óssea (BMP). A crista neural, após terminar a sua migração da linha média do ectoderma para dar origem à proeminência frontonasal e aos arcos faríngeos, é dominada por centros de crescimento regionais dos quais o BMP contribui não só para a forma e funcionalidade dos traços faciais, como também regula o crescimento craniofacial pós-natal ao nível dos ossos cranianos, maxila, mandíbula, palato e dentes, em especial BMP4 e BMP2 expressos nos processos maxilares e mandibulares (Graf *et al.*, 2016). Neste contexto, são igualmente relevantes os genes MSX, em especial os genes MSX1 e MSX2, alvos diretos da sinalização dos BMP, expressos também no desenvolvimento de processos faciais incluindo a prominência frontonasal, especialmente na porção palatina do maxilar e no mesênquima dental. Adicionalmente, diversos estudos em animais confirmam a sua

importância no desenvolvimento maxilar, mandibular e do processo nasal (Brown *et al.*, 1993).

O gene da proteína tumoral p63 (TP63) codifica um fator de transcrição pertencente à família do gene p53, cuja função é gerir a sinalização do desenvolvimento e morfogênese epitelial (Liu *et al.*, 2012). Estudos têm demonstrado que este gene é a chave para a formação óssea, estimulando as células tronco mesenquimais (Deng *et al.*, 2017). Na embriogênese expressa-se no palato, removendo a periderme palatal, para que as células epiteliais se possam fundir, formando o palato, mediante a regulação do gene Factor de regulação de Interferon 6 (IRF6) que se encarrega da formação do periderme bem como da sua manutenção (Hu *et al.*, 2014).

Diversos estudos têm encontrado associações significativas entre polimorfismos em todos os genes mencionados anteriormente e o aparecimento de malformações craniofaciais, tanto sindrómicas como não sindrómicas, sendo as mais comuns as fissuras labiopalatinas.

### *1.2 Definição de fissuras labiopalatinas:*

As fissuras labiopalatinas (FLP) são anomalias ou malformações causadas por uma falha na fusão das estruturas embrionárias do lábio superior bem como do palato duro e mole. Isto acontece quando o processo normal de desenvolvimento dos seus componentes é interrompido, destacando-se as proeminências do ectomesênquima derivado da crista neural do mesencéfalo e o rombencéfalo, assim como as proeminências do mesoderma. Aproximadamente às 6 semanas de desenvolvimento embrionário dá-se a fusão das proeminências medial e lateral nasal com as proeminências maxilares, formando a base do nariz, narinas e lábio superior. A confluência destes componentes origina a união do palato primário. Por sua vez, às 8 semanas, o palato primário eleva-se e funde-se com o septo nasal, formando o palato secundário. Todo este processo é controlado por vários genes que determinam a migração, desenvolvimento, apoptose e forma dos tecidos faciais. Se durante alguma destas etapas o processo de fusão for interrompido surge uma FLP (Costello and Ruiz, 2012).

### *1.3 Classificação das fissuras labiopalatinas*

Existem diferentes classificações para as FLP. A classificação anatômica de Fissuras Craniofaciais de Tessier, proposta em 1974, é muito útil para os cirurgiões já que considera a posição e a extensão da fissura. Neste sistema, as FLP correspondem às primeiras posições na classificação (do 0 ao 3) de um sistema que vai do 0 ao 14 (Tessier, 1976). A classificação de base embriológica é particularmente útil em investigações científicas e segue o consenso genético que classifica as FLP em fissura labial sem fissura palatina (FL), fissura labial com ou sem fissura palatina (FL/P), fissura labial com fissura palatina (FLcP) e fissura do palato posterior sem fissura labial (FP). Para efeitos práticos decidiu-se usar esta última classificação para o presente trabalho.

### *1.4 Epidemiologia e distribuição das fissuras labiopalatinas*

A FLP é a malformação orofacial mais comum, com uma prevalência próxima de 1 por cada 10.000 nascimentos (Watkins et al., 2014). Esta proporção é geralmente maior em populações asiáticas e menor em populações africanas (Beaty et al., 2013).

Relativamente aos vários subtipos, a forma mais frequente da FLP é a fissura labiopalatina não-sindrômica (FLPns), correspondendo às formas de FLP que ocorrem sem associação a anomalias cognitivas ou estruturais maiores e cuja complexa etiologia envolve uma combinação de fatores de riscos ambientais e genéticos, apresentando padrões de herança poligénica não mendeliana (Leslie et al., 2017). Em contrapartida, as fissuras labiopalatinas sindrômicas (FLPs) ocorrem associadas a alterações cognitivas e outras anomalias estruturais e apresentam padrões de herança mendeliana (Leslie et al., 2017).

No que diz respeito à distribuição por género, as FLP são mais frequentes em homens do que em mulheres, numa proporção de 2 homens para cada mulher, (Sepúlveda Troncoso, Zúñiga and Araya, 2008; Saleem *et al.*, 2019), embora seja importante mencionar que a variação FP é mais comum em mulheres (proporção de 2 mulheres para cada homem em populações Europeias) (Mossey and Modell, 2012).

### *1.5 Fatores de risco para o aparecimento das Fissuras labiopalatinas*

O fator de risco ambiental mais estudado é o tabagismo, embora com resultados inconclusivos (Ericson, Källén and Westerholm, 1979; Khoury, Gomez-farias and Mulinare, 1989; Werler *et al.*, 1990; Maestri *et al.*, 1997; Wyszynski, Duffy and Beaty, 1997). No entanto, complicações metabólicas ou de nutrição, como a obesidade, déficit de ácido fólico e diabetes, podem estar também relacionadas (Wilcox *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2008).

GWAS têm apresentado evidências de peso para a existência de fatores genéticos na etiologia de FLP, com a identificação de vários loci de risco (Mangold, Ludwig and Nöthen, 2011; Ludwig *et al.*, 2012). Recentemente, múltiplos genes têm sido identificados como candidatos na etiologia da FLP, como TGFA, BCL3, DLX2, MSX1, LHX, TGFB3 (Prescott, Lees and Winter, 2000; Van den Boogaard *et al.*, 2000). Do mesmo modo, os estudos GWAS têm revelado diversos loci cromossômicos associados a fatores de risco para FLP: 1p, 1q, 2p, 3p, 3q, 4q, 6p, 8q, 10q, 13q, 14q, 15q, 16p, 17p, 17q, 19q, 20q, 1q32.2, 10q25.3, 17p13.1 e 20q12 (Sun *et al.*, 2015; Saleem *et al.*, 2019).

### *1.6 Objetivo da revisão bibliográfica*

No presente trabalho pretende-se identificar e sistematizar os polimorfismos mais frequentes, na pesquisa e responsáveis pelo aparecimento das FLPns, contribuindo para a difusão da compreensão da etiologia destas patologias.

## **II. Materiais e Métodos:**

Foi realizada uma pesquisa através das bases de dados da Pubmed e Science Direct para recolher todos os artigos relevantes que correspondessem às palavras-chave *polimorphism*, *mutation*, combinadas com as palavras *cleftlip*, *cleftpalate* e *nonsyndromic*.

Foram incluídos estudos de metanálise, series de casos, estudos coorte, estudos de caso-controlo e estudos originais.

Foram excluídas publicações com mais de 5 anos, estudos com resultados estatisticamente não significativos, estudos de interação de polimorfismos e fatores



ambientais, estudos com resultados negativos ao aparecimento de FLPns, estudos feitos em animais e publicações em língua não inglesa.

Com estes critérios, foram selecionados 59 artigos das bases de dados Pubmed e Science Direct, dos quais foram excluídas 17 publicações, 2 delas por serem estudos feitos em animais, 10 publicações por apresentarem resultados sem associação entre o polimorfismo estudado e as FLPns e 5 publicações que apresentaram resultados negativos na associação entre o polimorfismo e as FLPns. Foram assim utilizados um total de 42 publicações para a pesquisa de SNP.

Na construção do marco teórico e na discussão foram ainda utilizados 38 outros artigos procurados para esclarecer aspetos específicos o que fez um total de 80 referências bibliográficas.

### **III. Resultados**

Nos 42 artigos encontrados descrevendo polimorfismos associados a FLPns são identificados 173 polimorfismos associados ao aparecimento das FLPns. Destes, os mais citados no gene IRF6 foram o rs2235371 e rs642961; no gene MSX1 o rs12532 e o rs6446693; no gene BMP4 o rs17563; no gene TGF- $\beta$ 3 o rs2268625. Os restantes polimorfismos foram sempre citados por apenas um trabalho.

As populações estudadas nos mesmos 42 artigos foram muito variadas, tanto em etnia como em localização geográfica, sendo que para efeitos práticos classificaram-se como Asiática (China, Sudeste e Nordeste Asiático e Índia), Europeia, Latino-americana, Norte-americana, Africana e do Médio Oriente.

A população que apresentou um maior número de polimorfismos foi a Latino-americana com 48% de polimorfismos associados, seguida da população Asiática (China e Sudeste Asiático) que apresentou 23% de todos os polimorfismos estudados. Os estudos da população Europeia também têm bastante relevância nesta revisão, representando 10% dos estudos. As restantes populações não apresentaram um número significativo de polimorfismos associados e alguns estudos não especificaram o tipo de população estudada (12%), centrando-se unicamente no gene estudado.

Com base no número de pesquisas que identificaram o mesmo polimorfismo associado ao aparecimento de FLPns para uma população específica, observa-se que para a população Latino-americana os polimorfismos mais estudados são o rs6446693 e o

rs12532, localizados no gene MSX1 (Araujo, Rodrigo and Temis, 2015; Ibarra-Arce *et al.*, 2016; Suazo *et al.*, 2018; Lancia *et al.*, 2020). Por sua vez, na população Asiática (China e Sudeste Asiático) os polimorfismos mais estudados parecem ser o rs2235371 e o rs642961 localizados no gene IRF6 e o rs17563 localizado no gene BMP4 (Sun *et al.*, 2015; Wattanawong, Rattanasiri, McEvoy, *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019). Para a população Europeia o gene que maior número de polimorfismos apresentou foi o GREM1 (Ludwig *et al.*, 2016).

Em relação ao tipo de FLPns associada aos diferentes polimorfismos, verifica-se que 90% dos polimorfismos estão associados ao aparecimento de FL/P sem preferência de nenhum grupo étnico específico, enquanto que as FP só representam 6,1% das associações a polimorfismos, em especial aqueles localizados nos genes GLR3, WnT5a e UGT3A2 que aparentam ter relevância para a população Europeia. Os polimorfismos localizados nos genes BMP4, TBX1 e MACROD2 parecem afetar predominantemente a população Asiática (China e Sudeste Asiático) para FP. As FLcP foram associadas a 5,5% dos polimorfismos identificados nesta revisão com aparente predileção na população Asiática (China e Sudeste Asiático) em especial aqueles localizados nos genes WNT10A, BMP4 e FOXE1. Por último, as FL só foram associadas a 3 polimorfismos e sem especificidade por nenhuma população. É também importante destacar que os SNP rs2235371 em IRF6 (Sun *et al.*, 2015; Wattanawong, Rattanasiri, Mcevoy, *et al.*, 2016; Bezerra *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019) e rs17563, rs76242 e rs10130587 em BMP4 (Li *et al.*, 2017; Hao *et al.*, 2018; Bahrami *et al.*, 2020) foram associados a mais do que um tipo de FLPns.

## IV. Discussão

### 4.1 Polimorfismos em IRF6

Hoje em dia, parece ser consensual que as FLPns são patologias multifatoriais, ou seja, que têm origem na interação de fatores genéticos e ambientais. Um dos genes que consistentemente surge associado a estas patologias é o IRF6. Com efeito, na bibliografia encontrada no presente trabalho, este foi um dos genes que mais SNP apresentou associados às FL/P, representando 6,7% de todos os polimorfismos estudados, com destaque em todas as populações estudadas para os SNP rs642961 e rs2235371.

O SNP rs2235371 é uma variante missense que substitui Valina por Isoleucina na posição do aminoácido 274 (V274I) e foi um dos primeiros polimorfismos fortemente associados ao aparecimento de FL/P em populações Asiáticas (China, Sudeste Asiático e Indiana) (Sun *et al.*, 2015; De Souza *et al.*, 2016; Gurramkonda *et al.*, 2017). O SNP rs642961 é uma variante localizada dentro de um *enhancer* ~10Kb anterior ao início da região de transcrição do gene IRF6 e tem sido etiquetado como uma causa variante de FL/P em populações descendentes de Europeus (Wang *et al.*, 2012).

O gene IRF6 codifica uma proteína que é um membro do fator de transcrição do Interferão que é importante para o desenvolvimento da cavidade oral e da região maxilofacial. Este é expresso no bordo medial do epitélio da proeminência do palato imediatamente antes e durante a sua fusão (Knight *et al.*, 2006). Tem também um papel importante na formação e conservação do periderme oral e da regulação espaço-temporal dos tecidos essenciais para assegurar uma apropriada adesão do palato (Ingraham *et al.*, 2006). Por esta razão, mutações neste gene são um fator de risco importante para o aparecimento de fissuras labiais e palatinas (Tirado Amador, Anaya and González Martínez, 2016). Polimorfismos deste gene também têm sido identificados em FLP sindrómicas desde a síndrome de Van der Woude até à síndrome de Pterígio poplíteo. Autores como Kerameddin identificaram o polimorfismo rs642961 como um possível marcador para a severidade clínica das FLP (Kerameddin *et al.*, 2015).

Estudos em animais parecem também confirmar que o gene IRF6 se encontra envolvido na proliferação e diferenciação dos queratócitos (Richardson *et al.*, 2009) e que a hiperproliferação da epiderme poderia resultar numa falha na diferenciação final destes, bem como numa adesão epitelial que levaria ao aparecimento de uma FLP (Ingraham *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2006).

O primeiro grande estudo genético sobre as FL/P (Zuccherro and *et al.*, 2004) detetou um SNP missense (rs2235371; V274I) fortemente associado às FL/P no Leste Asiático, mas não na população Europeia. Isto pode ser explicado pelo facto do alelo codificante para Isoleucina estar raramente presente nesta população. Em contrapartida, o SNP rs642961 também no gene IRF6 tem apresentado associação à FL/P em populações Europeias e de origem Asiática (China e Sudeste Asiático) (Rahimov *et al.*, 2008).

Os dois SNP citados (rs2235371 e rs642961) juntamente com o rs2013123 foram escolhidos por apresentarem um número suficiente de estudos para uma metanálise

(Wattanawong et al., 2016) concluindo que os 3 polimorfismos apresentaram uma associação significativa com as FLP.

Num outro estudo realizado na população Asiática (China e Sudeste Asiático) por Sun et al. em 2015, onde foi realizado um GWAS para duas coortes e posterior metanálise para as combinar (total: coorte1 504 + coorte2 354 casos), foram encontrados 6 novos polimorfismos com associação significativa às FLP. Desses 6 SNP, dois apresentaram um forte desequilíbrio de ligação (LD) com os polimorfismos mencionados anteriormente em IRF6, sendo que, em particular, o rs10863790 apresentou um forte LD com rs2235371 e o SNP rs674433 teve um forte LD para rs642961. Estes resultados levam a crer que a combinação dos seus alelos é mais frequente do que o que se esperaria de uma forma aleatória, ou seja, que estes SNP estão estritamente relacionados.

Um estudo realizado numa população heterogênea Latino-americana (Brasil), obteve uma associação significativa entre o SNP rs2235371 e o aparecimento de FP. No entanto, os autores advertem que estes resultados devem ser interpretados com cautela devido ao baixo número de indivíduos investigados (186 casos). Já para a relação entre os polimorfismos estudados (entre eles o rs642961) e o aparecimento de FLP, não foi obtida uma associação significativa (Bezerra *et al.*, 2019). Estes resultados coincidem com um estudo de coorte realizado por De Souza et al. em 2016 no Brasil, onde foi encontrada uma associação significativa entre o SPN rs2235371 e FL/P mas não foi encontrada correlação entre o SNP rs642961 e as FL/P (De Souza *et al.*, 2016).

Por outro lado, um estudo realizado por Wu et al. em 2019 numa população Asiática (China e Sudeste Asiático) determinou que a variante homozigótica TT de SNP rs2235371 atuava como um fator protetor contra o aparecimento de FL/P. Concluiu-se então que o polimorfismo missense rs2235371 em IRF6 pode ter um papel importante no controlo do risco de aparecimento de FL/P para essa população. Estes resultados coincidem com a metanálise realizada por Xia et al. em 2017, onde obtiveram resultados similares para a variante T alélica rs2235371. Para resolver o conflito com estudos anteriores, especificaram que apenas é possível demonstrar uma associação positiva entre o polimorfismo e as FL/P para as variantes heterozigóticas no sul da China. Estes resultados diferem do norte da China, onde existe uma associação positiva para todas as variantes do polimorfismo (Xia *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019).

Em conjunto, estas evidências parecem indicar que a presença de mutações no gene IRF6 afeta de alguma maneira a proliferação e desenvolvimento celular no maciço facial do embrião, aumentando o risco de aparecimento de FL/P, ou atuando como fator protetor. Os SNP rs2235371 e rs642961 foram fatores comuns em quase todas as pesquisas realizadas sobre este gene, sendo selecionados para metanálise devido à grande quantidade de artigos publicados e por serem encontrados em vários estudos realizados em diferentes etnias. Podemos então dizer que estes são os SNP mais relevantes neste gene para o risco de FLPns nas populações Asiáticas e Europeias.

#### 4.2 Polimorfismos em MSX1

O MSX1 é um membro da família *Homeobox*. Expressa-se em várias estruturas embrionárias, das quais se destacam as envolvidas no desenvolvimento craniofacial, em especial a porção palatina do maxilar e o mesenquima dental. Diversos autores têm reportado que as mutações neste gene (a maioria do tipo deleção) estão associadas a síndromes autossômicas dominantes, como é o caso do Witkop que inclui entre as suas características a agenesia dental e o síndrome de Wolf-Hirschhorn caracterizado pelo transtorno do desenvolvimento facial (Suzuki *et al.*, 2004; Cardoso *et al.*, 2013).

A deficiência de MSX1 em ratos apresenta múltiplos defeitos craniofaciais, incluindo fissuras no palato secundário, anomalias severas nos ossos faciais, no osso martelo do ouvido médio e agenesia dental total (Satokata and Mass, 1994).

Estima-se que cerca de 2% de todas as FL/P surgem devido a mutações no gene MSX1 (Jezewski *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2005; Tongkobpetch and Siriwan, 2006). Lidral *et al.* em 1998 identificou mutações no primeiro exão deste gene e as suas associações com as FL/P (Lidral *et al.*, 1998). Desde então têm vindo a ser identificados inúmeros polimorfismos neste gene associados às FLP em diferentes populações.

Nesta revisão, os polimorfismos encontrados no gene MSX1 representaram cerca de 4% de todos os polimorfismos detetados, sendo particularmente importante para a população Latino-americana e Asiática (China e Sudeste Asiático). Dos polimorfismos reportados na região Latino-americana, 6% foram associados a este gene. Os SNP mais citados foram o rs6446693 e o rs12532.

A proposição de que vários genes são suscetíveis a polimorfismos que aumentam o risco de aparecimento de FLP, leva a concluir que vários desses genes pertencem a vias comuns e interrelacionadas durante o desenvolvimento craniofacial. Motivo pelo qual Suazo et al. em 2018 realizaram na América Latina (Chile) um estudo de interação em vários polimorfismos, em diversos genes. Foi então encontrada uma evidência estatisticamente significativa de interação gene-gene para os SNP rs6446693 no gene MSX1 e rs2268625 no gene TGF $\beta$ 3, ambos SNP reportados como marcadores de risco para FL/P (Suazo *et al.*, 2018).

Numa metanálise feita por Gu et al. em 2018 sobre polimorfismos em MSX1 e a sua associação com as FLPns, verificou-se que o SNP rs12532 era o mais estudado e que tinha uma associação significativa com as FP em modelos heterozigóticos em populações Asiáticas (China e Sudeste Asiático) e do Médio Oriente. No entanto, estudos realizados no Brasil e no México, não têm tido sucesso a replicar esses resultados, indicando a presença de heterogeneidade entre os grupos (Gu *et al.*, 2018).

Numa outra metanálise realizada por Tasanarong et al. em 2019, foram analisados diversos grupos de polimorfismos em MSX1, entre eles o rs12532 e o rs6446693 em subgrupos distintos. Os resultados indicaram que o subgrupo onde estava o rs12532 apresentava-se como um fator protetor para as FLPns, contrariamente ao subgrupo onde se encontrava o rs644693, que apresentou uma associação positiva com o aparecimento de FLPns (Tasanarong and Pabalan, 2019).

É importante mencionar que, devido à maioria dos polimorfismos neste gene serem de deleção e estes levarem à deficiência de MSX1, é lógico pensar que esta deficiência conduza, além das FLPns, também à agenesia de órgãos dentais, motivo pelo qual é amplamente estudado pela medicina dentária embora os polimorfismos estudados até à data não tenham apresentado associações estatisticamente significativas entre as FLPns onde se deteta este gene e as agenesias dentárias (Lancia *et al.*, 2020).

Num estudo de caso-controlo realizado por Ibarra-Arce et al. em 2016 num hospital do México, foi identificada uma região não codificante 5' próxima do gene MSX1, mais especificamente entre rs868257 e rs6446693, associada ao aparecimento de FL/P (Ibarra-Arce *et al.*, 2016).

Noutro estudo de caso-controlo realizado numa população Asiática (só a Índia), foi encontrada uma associação positiva entre uma variante sinónima de SNP em MSX1 (alelo T de rs34165410) e o aparecimento de FL/P (Kumari, Singh and Raman, 2019).

O papel exato do MSX1 nas FLPns não está esclarecido por completo. Este gene aparenta promover o crescimento e diferenciação celular (Endo, 2007) mas as associações encontradas entre os SNP e as FLPns apresentam resultados diferentes. Por exemplo, o rs12532 apresentou uma associação positiva para a População Iraniana (Rafighdoost *et al.*, 2013) mas não para pacientes Chilenos (Suazo *et al.*, 2010) e o rs6446693 apresentou uma associação positiva para FLPns na população da Estónia (Jagomagi *et al.*, 2010) mas não para a população espanhola (Cardoso *et al.*, 2013). A maior parte dos autores referem então que são precisos mais estudos para melhor esclarecer o risco de FLP.

#### 4.3 Polimorfismo em BMP4:

O gene BMP4 (proteína morfogenética óssea 4) é um regulador com um papel essencial na indução da mesoderme, indução óssea, formação dos membros, desenvolvimento dentário e facial. Localizado em 14q22-23, contém 4 exões e cerca de 7kb. O produto deste gene liga-se a TGF- $\beta$ , o qual tem grande importância no desenvolvimento embrionário. Variações neste gene estão associadas às FLP e a microftalmia em humanos. Assim, a perda de funções deste gene em ratos resulta em malformações craniofaciais severas, incluindo fissuras labiais e palatinas (Juriloff and Harris, 2008) e, em concordância com os modelos animais, vários estudos analisaram o risco de SNP de BMP4 para as FLP sendo o rs17563 o mais estudado (Saleem *et al.*, 2019). Este SNP é a única variante genética identificada na região codificante do gene BMP4 (Babu *et al.*, 2005). Numa metanálise realizada por Bahrami *et al.* em 2020, onde foram analisados os 14 estudos de caso-controlo mais relevantes relativos à associação entre FLP e o rs17563, concluiu-se que este polimorfismo tem sido amplamente estudado nas populações da China, Brasil e Irão e que o rs17563 não está associado a um risco elevado para a população geral. No entanto, pode ser um fator de risco significativo para o aparecimento das FLP nas populações Chinesa e Brasileira, mas não para a Iraniana (Bahrami *et al.*, 2020). No seguimento destes resultados, foi realizado um outro estudo por Rafighdoost *et al.* em 2017, onde foi estudada a associação deste SNP e vários polimorfismos em

AXIN2 e IRF6, verificando-se que estas associações reduzem os riscos de aparecimento de FL/P na população iraniana, sugerindo também que devem ser realizados mais estudos com uma amostra mais elevada e com diferentes etnias para confirmar os resultados (Rafighdoost *et al.*, 2017).

Em 2017 Li et al fizeram uma metanálise de 11 estudos de caso-controlo para avaliar a associação entre o rs17563 e as FLP. Os resultados sugerem que este SNP poderia ser um fator de risco para o aparecimento de FLPns em Asiáticos e Caucásianos, mas um possível fator de proteção para os Brasileiros (Li *et al.*, 2017).

Por sua vez, Hao et al em 2018 realizaram um estudo de caso-controlo onde analisaram 165 indivíduos com diferentes tipos de FL/P não síndromicas e a sua associação com diferentes polimorfismos em BMP4. Concluíram que o SNP rs17563 estava significativamente associado ao aparecimento de FL mas não de FP nem de FLcP, sugerindo que as diferentes formas de FLPns poderiam ter diferentes origens (Hao *et al.*, 2018).

Estas diferenças na associação do rs17563 com as diferentes formas de FLPns podem explicar parcialmente os conflitos nos resultados de diferentes estudos, uma vez que a sua maioria estudam as FLPns como um todo em vez das suas diferentes apresentações. Isto pode influir nos resultados, dependendo de que o tipo de FLPns seja o mais representativo da amostra estudada nas diferentes populações, acrescentando também as diferenças entre o número de indivíduos estudados em cada pesquisa e os diferentes métodos estatísticos utilizados.

#### 4.4 Polimorfismo em $TGF\beta 3$ :

O gene  $TGF\beta$  pertence à família de genes do fator de crescimento e desenvolvimento, junto com o BMP. Esta família de genes  $TGF\beta$  permite o desenvolvimento de uma série de processos biológicos como a proliferação celular, diferenciação celular transformação do epitélio mesenquimal, migração e apoptose. Os genes  $TGF\beta 1$  e  $TGF\beta 2$  favorecem a aproximação dos processos verticais e horizontais para a fusão do palato, enquanto que o  $TGF\beta 3$  contribui na degradação de membranas e regula a resposta das metaloproteínas que intervêm na remodelação da matriz extracelular, processo indispensável para a fusão do palato (Stanier and Moore, 2004).



Estudos em modelos animais, majoritariamente em roedores, têm concluído que falhas na expressão do TGF $\beta$ 3 leva a falhas na expressão do gene MSX1, trazendo consigo uma deficiência na proliferação dos processos palatais horizontais, acabando numa FP (Del Ríó *et al.*, 2011).

Em concordância com os modelos animais, vários estudos de associação em populações etnicamente contrastantes têm obtido resultados positivos na associação do TGF $\beta$ 3 e das FLPns. Ichikawa *et al.* em 2006 determinou que o gene TGF $\beta$ 3 tem um papel importante no aparecimento de FL/P na população Japonesa (Ichikawa, Watanabe and Nakano, 2006).

Suazo *et al.* em 2010 estudaram um grupo de 150 indivíduos na América Latina (Chile), onde existia um LD entre os SNP rs3917201 e rs2268625, ambos em TGF $\beta$ 3, estes dois polimorfismos apresentavam associação positiva com as FLPns. O mesmo autor em 2018 estudou as interações Gene-Gene através do uso de trios *case-parent* num grupo de 152 pessoas, também no Chile, e encontrou uma interação significativa entre os SNP rs6446693 em MSX1 e o rs2268625 em TGF $\beta$ 3. Verificou-se também que esta interação incrementava o risco de aparecimento de FL/P não sindrômicas (Suazo *et al.*, 2010, 2018). Nesta revisão pode-se observar que o SNP rs2268625 em TGF $\beta$ 3 parece estar presente em grande parte dos estudos de associação entre genes e polimorfismos associados às FLPns na população Latino-americana (Brasil e Chile). A maioria dos autores concluem que estas interações são bastante importantes para a compreensão das FLP.

## V. Conclusão

Através da presente revisão, pode-se concluir que o processo complexo que leva ao aparecimento das FLPns é modulado por múltiplos genes. Muitos estudos têm demonstrado que a coordenação e o relacionamento entre si parece ser um fator importante no aparecimento desta patologia.

Diversos estudos de modelos animais têm referido vários genes e SPN candidatos para a procura das mesmas variantes em humanos. Vários autores têm tido êxito na associação destes SPN candidatos e o aparecimento de FLPns em humanos.

Nesta revisão da literatura verifica-se que os genes e polimorfismos mais estudados nos últimos 5 anos são o IRF6 rs2235371 e o rs642961 na população Asiática (China, Sudeste Asiático e Índia), o MSX1 rs12532 e rs6446693 e o BMP4 rs17563 na população da América Latina (México e Chile), na população Asiática (China, Sudeste Asiático e Índia) e no Medio Oriente (Irão), e o TGF $\beta$ 3 rs2268625 na população da América Latina (Chile) e Asiática (apenas no Nordeste Asiático). Destaca-se também que, devido à grande variabilidade de apresentação das FLPns, muitos estudos não se centram especificamente em uma alteração patológica específica, levando a possíveis erros no momento de associar um SNP às populações estudadas. São então precisos mais estudos para compreender melhor o mecanismo que leva ao aparecimento de cada tipo de fissura e esclarecer as discrepâncias entre os diferentes autores.

## VI. Bibliografia

- Adhikari, K. *et al.* (2016). A genome-wide association scan implicates DCHS2, RUNX2, GLI3, PAX1 and EDAR in human facial variation. *Nature Communicationscommunications*, 11616(7), pp. 1–11.
- Araujo, T., Rodrigo, S. and Temis, F. (2015). A multicentric association study between 39 genes and nonsyndromic cleft lip and palate in a Brazilian population. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. Elsevier Ltd, 44(1), pp. 16–20.
- Babu, L. R. *et al.* (2005). Bone mass effects of a BMP4 gene polymorphism in postmenopausal women. *Bone*, 36, pp. 555–561.
- Bahrami, R. *et al.* (2020). Association of BMP4 rs17563 Polymorphism with Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate Risk : Literature Review and Comprehensive Association of BMP4 rs17563 Polymorphism with Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate Risk : Literatur. *Fetal and Pediatric Pathology*. Taylor & Francis, 0(0), pp. 1–15.
- Beaty, T. H. *et al.* (2013). Confirming genes influencing risk to cleft lip with/without cleft palate in a case-parent trio study. *Human Genetics*, 132(7), pp. 771–781.
- Bezerra, J. *et al.* (2019). IRF6 polymorphisms in Brazilian patients with non-syndromic cleft lip with or without palate &. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, ARTICLE IN.
- Van den Boogaard, M.-J. H. *et al.* (2000). MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nature Genetics*, 24(4), pp. 342–343.
- Brown, J. M. *et al.* (1993). Experimental analysis of the control of expression of the homeobox-gene Msx-1 in the developing limb and face. *The Company of Biologists Limited*, 119, pp. 41–48.
- Cardoso, M. L. *et al.* (2013). MSX1 gene polymorphisms in non-syndromic cleft lip and / or palate. *Oral Diseases*, 19, pp. 507–512.
- Cesario, J. M. *et al.* (2017). Expression of Forkhead box transcription factor genes Foxp1 and Foxp2 during jaw development. *Gene Expr Patterns.*, 20(2), pp. 111–119.
- Claes, P. *et al.* (2014). Modeling 3D Facial Shape from DNA. *PLOS Genetics*, 10(3), pp. 1–14.

- Claes, P. and Shriver, M. D. (2016). New Entries in the Lottery of Facial GWAS Discovery. *PLOS Genetics*, 12(8), pp. 8–11.
- Cole, J. B. *et al.* (2016). Genomewide Association Study of African Children Identifies Association of SCHIP1 and PDE8A with Facial Size and Shape. *PLOS Genetics*, 12(8), pp. 1–19.
- Correa, A. *et al.* (2008). Diabetes mellitus and birth defects. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 199(237), pp. 1–9.
- Costello, B. J. and Ruiz, R. L. (2012). Cleft Lip and Palate. in *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*. SHELTON, CONNECTICUT: People's Medical Publishing House- USA, Ltd, pp. 945–964.
- Deng, M. *et al.* (2017). TGF  $\beta$  3 recruits endogenous mesenchymal stem cells to initiate bone regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*, 258(8), pp. 1–12.
- Endo, T. (2007). Stem cells and plasticity of skeletal muscle cell differentiation : potential application to cell therapy for degenerative muscular diseases. *Regenerative Med.*, 2(3), pp. 243–256.
- Ericson, A., Källén, B. and Westerholm, P. (1979). Cigarette smoking as an etiologic factor in cleft lip and palate. *Am J Obstet Gynecol*, 135(3), pp. 348–51.
- Graf, D. *et al.* (2016). Common mechanisms in development and disease: BMP signaling in craniofacial development. *Cytokine Growth Factor Rev*, 27(1), pp. 129–139.
- Gu, M. *et al.* (2018). MSH homeobox 1 polymorphisms and the risk of non-syndromic orofacial clefts : a meta-analysis. *European Journal of Oral Sciences*, 00, pp. 1–6.
- Gurramkonda, B. *et al.* (2017). IRF6 rs2235375 single nucleotide polymorphism is associated with isolated non-syndromic cleft palate but not with cleft lip with or without palate in South Indian population &. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial, 84(4), pp. 473–477.
- Hao, J. *et al.* (2018). Archives of Oral Biology Association between BMP4 gene polymorphisms and cleft lip with or without cleft palate in a population from South China. *Archives of Oral Biology*. Elsevier, 93(January), pp. 95–99.

- Hu, L. *et al.* (2014). TGF b 3 Regulates Periderm Removal Through D Np63 in the Developing Palate. *Journal of Cellular Physiology*, 230(October), pp. 1212–1225.
- Ibarra-Arce, A. *et al.* (2016). MSX1 gene polymorphisms in Mexican patients with non-syndromic cleft lip/palate. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. Elsevier Ltd, 90, pp. 119–124.
- Ichikawa, E., Watanabe, A. and Nakano, Y. (2006). PAX9 and TGFB3 are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese : population-based and family-based candidate gene analyses, pp. 38–46.
- Ingraham, C. R. *et al.* (2006). Abnormal skin, limb and craniofacial morphogenesis in mice deficient for interferon regulatory factor 6 (Irf6). *Nat Genet*, 38(11), pp. 1335–1340.
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *NATURE*, 409(15), pp. 860–921.
- Jagomagi, T. *et al.* (2010). MTHFR and MSX1 contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip / palate. *European Journal of Oral Sciences*, 118, pp. 213–220.
- Jezewski, P. A. *et al.* (2003). Complete sequencing shows a role for. *J Med Genet*, 40, pp. 399–407.
- Juriloff, D. M. and Harris, M. J. (2008). Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 82(2), pp. 63–77.
- Kerameddin, S. *et al.* (2015). IRF6 Is a Marker of Severity in Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *Journal of Dental Research*, 94(September), pp. 226S-232S.
- Khoury, M. J., Gomez-farias, M. and Mulinare, J. (1989). Does Maternal Cigarette Smoking During Cause Cleft Lip and Palate in Offspring ? *Pregnancy*, 38(n 107), pp. 2–6.
- Knight, A. S. *et al.* (2006). Developmental Expression Analysis of the Mouse and Chick Orthologues of IRF6 : The Gene Mutated in Van Der Woude Syndrome. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, 235, pp. 1441–1447.
- Kumari, P., Singh, S. K. and Raman, R. (2019). TGFβ3, MSX1, and MMP3 as Candidates for NSCL±P in an Indian Population. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*,

56(3), pp. 363–372.

Lancia, M. *et al.* (2020). Archives of Oral Biology Association between MSX1 rs12532 polymorphism with nonsyndromic unilateral complete cleft lip and palate and tooth agenesis. *Archives of Oral Biology*. Elsevier, 109(2020), p. 104556.

Leslie, E. J. *et al.* (2017). 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. *Human Genetics*. Springer Berlin Heidelberg, 136(3), pp. 275–286.

Li, Y. *et al.* (2017). BMP4 rs17563 polymorphism and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Medicine*, 96(31), pp. 1–6.

Lidral, A. C. *et al.* (1998). Association of MSX1 and TGFB3 with Nonsyndromic Clefting in Humans. *American Journal of Human Genetics*, 63, pp. 557–568.

Liu, F. *et al.* (2012). A Genome-Wide Association Study Identifies Five Loci Influencing Facial Morphology in Europeans. *PLOS Genetics*, 8(9), pp. 1–13.

Ludwig, K. U. *et al.* (2012). Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 44(9), pp. 968–971.

Ludwig, K. U. *et al.* (2016). Meta-analysis Reveals Genome-Wide Significance at 15q13 for Nonsyndromic Clefting of Both the Lip and the Palate, and Functional Analyses Implicate GREM1 As a Plausible Causative Gene. *PLoS Genetics*, 12(3), pp. 1–21.

Maestri, N. E. *et al.* (1997). Application of Transmission Disequilibrium Tests to Nonsyndromic Oral Clefts : Including Candidate Genes and Environmental Exposures in the Models. *American Journal of Medical Genetics*, 344, pp. 337–344.

Mangold, E., Ludwig, K. U. and Nöthen, M. M. (2011). Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. *Trends in Molecular Medicine*, 17(12), pp. 725–733.

Mossey, P. A. and Modell, B. (2012). Epidemiology of oral clefts: an international perspective, in Cleft lip and palate. *Front Oral Biol.*, 16, pp. 1–18.

Prescott, N. J., Lees, M. M. and Winter, R. M. (2000). Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan

of affected sib-pairs. *Human Genetics*, 106, pp. 345–350.

Rafighdoost, H. *et al.* (2013). Association Between CDH1 and MSX1 Gene Polymorphisms and the Risk of Nonsyndromic Cleft Lip and / or Cleft Palate in a Southeast Iranian Population. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 50(5), pp. 98–104.

Rafighdoost, H. *et al.* (2017). Association of single nucleotide polymorphisms in AXIN2, BMP4, and IRF6 with Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate in a sample of the southeast Iranian population. *Journal of Applied Oral Science*, 25(6), pp. 650–656.

Rahimov, F. *et al.* (2008). Disruption of an AP-2 $\alpha$  binding site in an IRF6 enhancer is strongly associated with cleft lip. *Nat Genet*, 40(11), pp. 1341–1347.

Richardson, R. J. *et al.* (2006). Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. *NATURE GENETICS*, 38(11), pp. 1329–1334.

Richardson, R. J. *et al.* (2009). Integration of IRF6 and Jagged2 signalling is essential for controlling palatal adhesion and fusion competence. *Human Molecular Genetics*, 18(14), pp. 2632–2642.

Del Río, A. *et al.* (2011). Analysis of the Presence of Cell Proliferation-Related Molecules in the Tgf- $\beta$  3 Null Mutant Mouse Palate Reveals Misexpression of EGF and Msx-1. *Cells Tissues Organs*, 193, pp. 135–150.

Roosenboom, J. *et al.* (2016). Exploring the Underlying Genetics of Craniofacial Morphology through Various Sources of Knowledge. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 2016, pp. 1–9.

Saleem, K. *et al.* (2019). Heliyon Assessment of candidate genes and genetic heterogeneity in human non syndromic orofacial clefts specifically non syndromic cleft lip with or without palate. *Heliyon*. Elsevier Ltd, 5(May), p. e03019.

Satokata, I. and Mass, R. (1994). Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *NATURE GENETICS*, 6(april 1994), pp. 348–356.

Sepúlveda Troncoso, H., Zúñiga, P. and Araya, C. A. (2008). Prevalencia de fisura labiopalatina e indicadores de riesgo : Estudio de la población atendida en el Hospital Clínico Félix Bulnes de Santiago de Chile \* Prevalence of cleft lip and palate and risk indicators : Study of the reference population of Felix B. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*,

30(1), pp. 17–25.

Shaffer, J. R. *et al.* (2016). Genome-Wide Association Study Reveals Multiple Loci Influencing Normal Human Facial Morphology. *PLOS Genetics*, 12(8), pp. 1–21.

Som, P. M., Streit, A. and Naidich, T. P. (2014). Illustrated Review of the Embryology and Development of the Facial Region , Part 3 : An Overview of the Molecular Interactions Responsible for Facial Development. *AJNR Am J Neuroradiol*, 35(Feb 2014), pp. 223–229.

De Souza, L. *et al.* (2016). Study of IRF6 and 8q24 region in non-syndromic oral clefts in the Brazilian population. *Oral Diseases*, 22(2016), pp. 241–245.

Stanier, P. and Moore, G. E. (2004). Genetics of cleft lip and palate : syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human Molecular Genetics*, 13(1), pp. 73–81.

Suazo, J. *et al.* (2010). Parent-of-Origin Effects for MSX1 in a Chilean Population With Nonsyndromic Cleft Lip / Palate. *American Journal of Medical Genetics*, Part A(152A), pp. 2011–2016.

Suazo, J. *et al.* (2018). Gene-gene interaction for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chilean case-parent trios. *Archives of Oral Biology*. Elsevier, 91(April), pp. 91–95.

Sun, Y. *et al.* (2015). Genome-wide association study identifies a new susceptibility locus for cleft lip with or without a cleft palate. *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6(6414), pp. 1–7.

Suzuki, Y. *et al.* (2004). In a Vietnamese population , MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genetics IN Medicine*, 6(3), pp. 117–125.

Tasanarong, P. and Pabalan, N. (2019). MSX1 gene polymorphisms and non - syndromic cleft lip with or without palate ( NSCL / P ): A meta - analysis. *Oral Diseases*, 00, pp. 1–10.

Tessier, P. (1976). Anatomical Classification of Facial , Cranio-Facial and Latero-Facial Clefts \*. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 4(1976), pp. 69–92.

The International HapMap Consortium. (2003). The International HapMap Project. *NATURE*, 426(18/25), pp. 789–796.



Tirado Amador, L. R., Anaya, M. V. M. and González Martínez, F. D. (2016). Genetic and epigenetic interactions related to non-syndromic cleft lip and palate. *Avances en Odontoestomatología*, 32(1), pp. 21–34.

Tongkobpetch, S. and Siriwan, Æ. P. (2006). MSX1 mutations contribute to nonsyndromic cleft lip in a Thai population. *J Hum Genet*, 51, pp. 671–676.

Twigg, S. R. F. and Wilkie, A. O. M. (2015). New insights into craniofacial malformations. *Human Molecular Genetics*, 24(R1), pp. R50–R59.

Vieira, A R *et al.* (2005). Medical Sequencing of Candidate Genes for Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *PLoS Genetics*, 1(6), pp. 0651–0659.

Wang, M. *et al.* (2012). Three Polymorphisms in IRF6 and 8q24 Are Associated With Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate : Evidence From 20 Studies. *Am J Med Genet, Part A(158A)*, pp. 3080–3086.

Watkins, S. E. *et al.* (2014). Classification, epidemiology, and genetics of orofacial clefts. *Clinics in Plastic Surgery*. Elsevier Inc, 41(2), pp. 149–163.

Wattanawong, K., Rattanasiri, S., Mcevoy, M., *et al.* (2016). Association between IRF6 and 8q24 Polymorphisms and Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate : Systematic Review and Meta-analysis, pp. 1–16.

Wattanawong, K., Rattanasiri, S., McEvoy, M., *et al.* (2016). Association between IRF6 and 8q24 polymorphisms and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: Systematic review and meta-analysis. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 106(9), pp. 773–788.

Weinberg, S. M. (2014). Heritability of Face Shape in Twins: A Preliminary Study using 3D Stereophotogrammetry and Geometric Morphometrics. *Dent 3000.*, 1(1), pp. 1–11.

Werler, M. *et al.* (1990). Maternal cigarette smoking during pregnancy in relation to oral clefts. *AMERICAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY*, 132(5), pp. 926–932.

Wilcox, A. J. *et al.* (2007). Folic acid supplements and risk of facial clefts : national population based case-control study. *BMJ*, 1, pp. 1–6.

Wu, D. *et al.* (2019). Interaction between interferon regulatory factor 6 and glycine receptor beta shows a protective effect on developing nonsyndromic cleft lip with or

without cleft palate in the Han Chinese population. *European Journal of Oral Sciences*, 127(1), pp. 27–32.

Wyszynski, D. F., Duffy, D. L. and Beaty, T. H. (1997). Maternal Cigarette Smoking and Oral Clefts: A Meta-Analysis. *Cleft Palate Craniofac J*, 34(3), pp. 206–10.

Xia, Y. *et al.* (2017). Association between the IRF6 rs2235371 polymorphism and the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chinese Han populations: A meta-analysis. *Archives of Oral Biology*, 84(2017), pp. 161–168.

Zucchero, T. M. and *et al.* (2004). Interferon Regulatory Factor 6 ( IRF6 ) Gene Variants and the Risk of Isolated Cleft Lip or Palate. *The new england journal of medicine original*, 351(8), pp. 769–780.