

César Rivera<sup>1,2</sup>, María Jesús Arenas<sup>2</sup>

1.- Unidad de Histología y Embriología, Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca, Talca, Chile.

2.- Escuela de Odontología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca, Talca, Chile.

Contacto: Dr. César Rivera, Cirujano Dentista. Universidad de Talca Campus Norte, Edificio Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas, Avenida Lircay s/n Laboratorio de Morfología, Talca, Chile. Teléfono: +56-71-201756. Email: contacto@cesarrivera.cl.

## Bases ambientales y genéticas de las fisuras orofaciales: Revisión.

### *Narrative review: environmental and genetic basis of orofacial clefts*

**Resumen:** El desarrollo embriológico de las estructuras orofaciales es un proceso complejo guiado por programas genéticos. Alteraciones en esos procesos dan lugar a anomalías estructurales. Un ejemplo de ellas son las fisuras de labio y el paladar. Las principales vías involucradas en las fisuras tienen como participantes a las familias del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), Hedgehog (HH), Wingless (WNT) y la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), que incluye las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) y activinas. En esta revisión narrativa se presentan algunos de los procesos celulares, moleculares y factores ambientales implicados en el desarrollo del complejo orofacial, finalizando con posibilidades terapéuticas para la evidencia acumulada.

**Palabras claves:** desarrollo embrionario, labio fisurado, paladar fisurado, fisura orofacial.

Rivera C, Arenas MJ. Bases ambientales y genéticas de las fisuras orofaciales: Revisión. J Oral Res 2013; 2(1): 35-41.

Recibido: 27/02/13 | Revisado: 15/03/13 | Aceptado: 21/03/13 | Online: 21/03/13

### Introducción.

Las estructuras orofaciales (EO) tienen una compleja función en los seres humanos. Sus tejidos reciben y transmiten una gran cantidad de información cada día. Además, la apariencia otorgada por ellas es un componente esencial para la individualidad<sup>1</sup>. De existir alteraciones en los procesos embriológicos que originan las EO, éstas pueden manifestarse clínicamente como malformaciones<sup>2</sup>.

Las malformaciones que involucran estos territorios representan tres cuartas partes de los defectos congénitos (revisar Centers for Disease Control, Birth Defects Research and Prevention en <http://www.cdc.gov/ncbddd/bd/centers.htm>), esto puede atribuirse a los intrincados mecanismos involucrados en el ensamblaje de la región orofacial<sup>3</sup>.

Gran parte del conocimiento que se tiene respecto al rol que juegan genes específicos en la formación de la cabeza humana, tiene su origen en el estudio genómico de familias que presentan un trastorno particular orofacial o dental<sup>4</sup>.

Además, los modelos animales, particularmente de

ratón, se han convertido en herramientas valiosas para la comprensión de los procesos moleculares que gobiernan el desarrollo de la cara<sup>5</sup>. Los programas genéticos parecen ser altamente conservados en todos los vertebrados<sup>6</sup>. La tecnología de gen knock-out (eliminación/inactivación), por el cual un gen específico que se cree implicado en un trastorno humano orofacial, puede ser inactivado en un ratón, ofrece información valiosa sobre las malformaciones observadas en los humanos<sup>4</sup>. El estudio detallado de los fenotipos resultantes constituye el punto de partida para el descubrimiento de los mecanismos moleculares implicados en estas alteraciones.

En esta revisión narrativa se presentan algunos de los procesos celulares, moleculares y factores ambientales implicados en el desarrollo de las fisuras orofaciales. La información aquí entregada está orientada a clínicos y profesionales en formación. Finalmente, se presentan los beneficios clínicos que podrían derivarse de la evolución de las nuevas tecnologías combinadas con los conocimientos sobre las manifestaciones genéticas de las fisuras orofaciales.

## Desarrollo.

### Formación de la cabeza.

La formación de la cabeza se produce en las primeras etapas del desarrollo embrionario humano<sup>7</sup>. Este proceso es muy complejo y ocurre bajo un estrecho control genético. Los procesos genéticos, moleculares y celulares deben ser temporal y espacialmente regulados para culminar en estructuras tridimensionales<sup>8</sup>.

Para el desarrollo de la cara son de gran importancia un grupo de células pluripotenciales, llamadas células de la cresta neural craneal (CCNC). Estas células se desprenden desde el tubo neural en formación para migrar hacia los arcos faríngeos en desarrollo<sup>1</sup>.

Subgrupos de CCNC migran hacia zonas específicas, entremezclándose con la población existente de células del mesodermo. La proliferación de células CCNC es responsable del desarrollo de las estructuras alrededor de la futura cavidad oral. La continua proliferación de CCNC conduce a la formación de un único proceso frontonasal y pares de procesos maxilar y mandibular (Fig. 1). Con el avance del desarrollo, estos procesos se aproximan y fusionan dando origen a la cara<sup>8</sup>.

Las CCNC dan lugar a prácticamente todas las estructuras de la cara, con la excepción de los músculos, que se originan a partir de una población de células mesodérmicas<sup>9</sup>. La especificación y organización de las CCNC en distintos tejidos, se cimienta en el continuo diálogo existente entre el epitelio que cubre la cara y

la cavidad oral en desarrollo, a través de moléculas de señalización (principalmente factores de crecimiento) y factores de transcripción<sup>10</sup>.

Los factores de crecimiento implicados en el desarrollo orofacial pertenecen principalmente a cuatro familias: la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), la familia Hedgehog (HH), la familia Wingless (WNT) y la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGFB), que incluye las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) y las activinas<sup>11, 12</sup>. Alteraciones en esas familias y sus vías de señalización pueden dar origen a defectos disruptivos orofaciales de diversa complejidad<sup>4</sup>.

### Fisuras orofaciales.

El término de fisura orofacial se refiere a la presencia de una fisura en el labio y/o paladar de carácter no sindrómico (sin anomalías asociadas), que resulta en una discontinuidad epitelial, representada por una separación incompleta entre la cavidad oral y nasal<sup>13</sup>. Este es uno de los defectos congénitos más comunes, con una incidencia en Chile de 1 cada 650 nacidos vivos, lo que convierte a esta alteración en un problema de salud pública<sup>14</sup>. Los niños con labio y paladar fisurado o fisura labio palatina (FLP), presentan problemas durante la alimentación y comunicación, además pueden sufrir alteraciones en el desarrollo facial y en la erupción dentaria<sup>15</sup>.

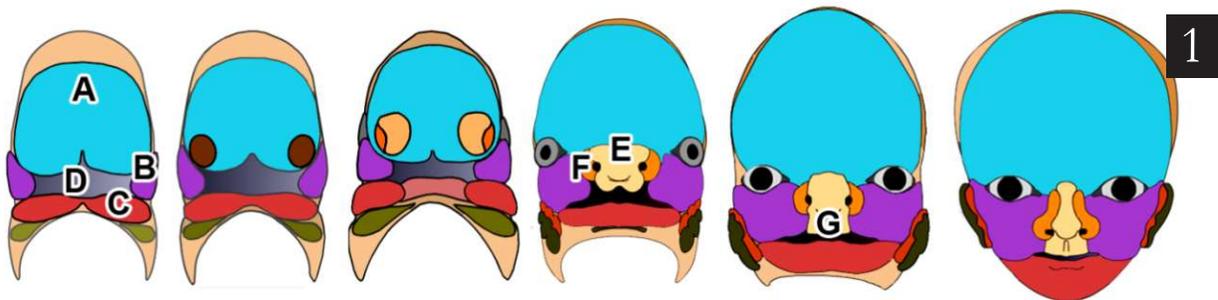


Figura 1. Desarrollo secuencial de las estructuras orofaciales. Procesos frontonasal (A), maxilar (B), mandibular (C), estomodeo (D), procesos nasal medial (E) y nasal lateral (F). La fusión de los procesos nasales mediales origina el segmento intermaxilar (G), que está constituido por un componente labial, uno maxilar (que contiene los 4 incisivos superiores) y otro palatino (que forma el paladar primario). Modificado de Stoffer, Development of The Face and Palate<sup>72</sup>.

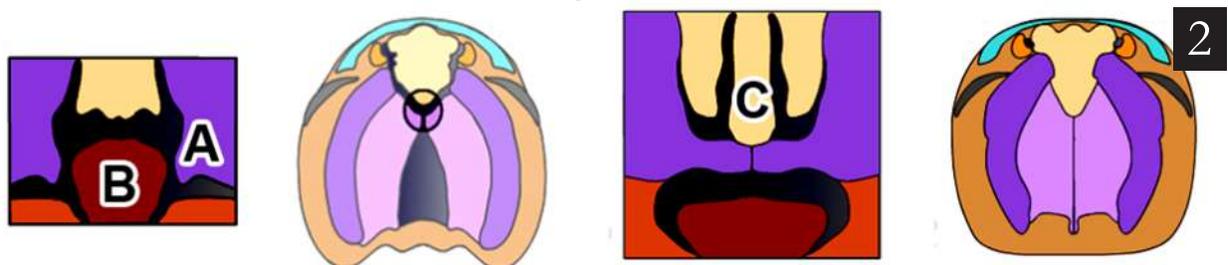


Figura 2. Palatogénesis. El segmento intermaxilar origina el paladar primario. El paladar secundario se constituye por la fusión de los procesos o crestas palatinas, que luego se elevan horizontalmente sobre la lengua. El septum nasal originado en el proceso frontonasal se fusiona con la superficie cefálica del paladar neoformado. Proceso o cresta palatina (A), lengua (B), septum nasal (C). Modificado de Stoffer, Development of The Face and Palate<sup>72</sup>.

El impacto de estos trastornos sobre la calidad de vida y la necesidad de prestaciones de salud de un alto costo, que involucran equipos multidisciplinarios integrados por cirujanos plásticos, pediatras, cirujanos maxilofaciales, otorrinolaringólogos, fonoaudiólogos, ortodoncistas y cirujanos dentistas, ha desencadenado una intensa investigación sobre las causas genéticas de estas condiciones.

La información originada de los análisis genéticos podría conducir al desarrollo de nuevas terapias preventivas y correctivas para los pacientes con FLP<sup>5</sup>.

### Factores ambientales.

Múltiples factores ambientales se encuentran relacionados con las fisuras orofaciales. La relación entre el tabaquismo materno y el FLP es significativa. La evidencia muestra que el riesgo relativo para el desarrollo de la fisura es de 1,5<sup>16</sup>. Si al hábito de fumar se suma una alteración genética en *MSX1* el riesgo de FLP aumenta 7,16 veces<sup>17</sup>.

Además, altos niveles de consumo de alcohol materno aumentan el riesgo de FLP entre 1,5 y 4,7 veces<sup>18</sup>. Las madres que consumen más de 5 tragos por ocasión tienen 3,4 veces más riesgo de dar a luz un niño con FLP<sup>12</sup>.

Se ha informado previamente que si suplementos de ácido fólico (AF) y cobalamina no fueron consumidos durante el embarazo el riesgo para FLP se triplica<sup>19</sup>. Recientemente ha comenzado un programa de prevención de fisuras orofaciales en Brasil, que involucra alrededor de 6.000 mujeres. En este programa se testearán dosis de AF de 4 mg y 0,4 mg.<sup>20</sup> Hasta ahora sólo existe evidencia que una dosis muy alta de suplemento de AF (10 mg/día) puede reducir significativamente el riesgo de FLP (65%)<sup>21</sup>. Chile también cuenta con un programa preventivo en relación al AF. La fortificación obligatoria de la harina de trigo se estableció a partir de enero de 2000 (2,0-2,4 mg de AF/kg), con la aprobación de la Norma Técnica sobre Fortificación de Harina de Trigo con Vitaminas y Minerales, que indica la obligatoriedad de adicionar AF (revisar Programa de Fortificación de Harinas en <http://www.ispch.cl/programa-de-fortificacion-de-harinas>), siendo su principal objetivo aumentar la ingesta de folatos, especialmente en mujeres en edad fértil (400 mg/día) y reducir la prevalencia de los defectos del tubo neural<sup>22</sup>.

En nuestro país, la fortificación de la harina de trigo con AF ha demostrado ser una estrategia efectiva para la prevención primaria de los defectos del tubo neural, con una reducción del 50%<sup>23,24</sup>. Pese a la evidencia para esos defectos, la prevención de las fisuras orofaciales no contaría con la misma suerte. El Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas informa

que en el periodo postfortificación, las cifras que involucran a las fisuras orofaciales se mantienen estables o en aumento<sup>25</sup>. Según Nazer *et al.* (2010) las mayores tasas de FLP observadas pueden corresponder a un resultado aleatorio y debe continuarse con los seguimientos futuros<sup>26</sup>. Por otra parte, López-Camelo *et al.* (2010), concluyen que la fortificación con AF previene los defectos del tubo neural, pero no otras anomalías congénitas, como las fisuras orofaciales<sup>27</sup>.

Los corticosteroides constituyen los fármacos de primera línea para el tratamiento de una variedad de condiciones de las mujeres en edad fértil. El papel de los corticoides en las fisuras orofaciales, a partir de modelos animales es conocido<sup>28</sup>. Se ha investigado la asociación entre el uso materno de corticosteroides durante el período periconcepcional (1 mes antes de la concepción hasta los 3 meses después de la concepción), encontrándose un aumento del riesgo de fisuras orofaciales<sup>29</sup>. Otro corticoide, la prednisona, no representa un riesgo teratogénico en dosis terapéuticas en seres humanos, sin embargo aumenta el riesgo de PF en 3,4 veces<sup>30</sup>.

Los anticonvulsivos (fenitoína/hidantoína, oxazolidinonas y el ácido valproico) se asocian con un aumento en el riesgo para defectos congénitos. Las tres clases terapéuticas son susceptibles de producir FLP, aunque de manera inconsistente<sup>31</sup>.

El estrés fisiológico materno podría facilitar el desarrollo de fisuras orofaciales. Un interesante estudio fue motivado por un terremoto (8.9 en la escala de Richter) de gran magnitud ocurrido en Chile el año 1985<sup>32</sup>. Desde tres hospitales públicos chilenos, se registraron las características de más de 22.000 nacimientos ocurridos ese año. Se encontró un aumento significativo en la tasa de fisuras orofaciales; 2,01 por cada 1000 nacimientos en contraste con 1,6 por 1000 nacidos en los años anteriores. El aumento de los casos de fisuras orofaciales fue mayor en los nacidos en septiembre de 1985, 3,8 por 1.000 nacimientos. Los investigadores desarrollaron un protocolo en ratones A/Sn (genéticamente sensibles a la generación de PF inducido por cortisona) y C57BL/10, exponiéndolos a condiciones similares al terremoto, mediante una caja vibratoria. Los resultados mostraron un 19,8% de PF en crías de ratones A/Sn, sin presencia de PF en C57BL/10 y controles. Ellos reportaron una sorprendente proporción de embriones reabsorbidos en los grupos de estrés, que aumentó de 8,3 a 49,3% en A/Sn y 5,8 a 48,3% en C57BL/10<sup>32</sup>.

### Anomalías genéticas asociadas con fisuras orales en los seres humanos.

Varios genes, proteínas y sus vías de señalización están implicados en el desarrollo de FLP (Tabla 1). Los animales de experimentación knock-out han

ayudado notablemente a identificar los factores de crecimiento y transcripción que son importantes para el desarrollo del primordio facial<sup>4</sup>. El desarrollo del primordio facial y sus procesos contribuye a la formación del labio y el paladar, donde la aproximación de esos tejidos debe producirse para finalizar con la fusión de las estructuras<sup>5</sup>.

Defectos de los factores de crecimiento o sus receptores han mostrado causar fisuras orofaciales en seres humanos<sup>12, 13</sup>.

El factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ ) se ha asociado con FLP. Al secuenciar el gen *TGFA* en un grupo de pacientes con FLP se encontró 5 mutaciones que podrían estar relacionadas con la etiología de las fisuras orofaciales<sup>33</sup>.

La combinación entre *TGFA* y el ambiente ha sido analizada por varios investigadores. Una variante polimórfica (variación en la secuencia de ADN) de *TGFA* (alelo TaqI C2) y la presencia de tabaquismo materno pueden aumentar el riesgo de PF en 6-8 veces<sup>34</sup> y la de LF con o sin PF en 2 veces<sup>35</sup>. Si no se consumen multivitamínicos durante el primer trimestre del embarazo y el bebé es portador del alelo TaqI C2, el

riesgo relativo para el PF con o sin LF aumenta 3,8 veces<sup>35</sup>.

Estudios de ligamiento y secuenciación en familias con fisuras orofaciales han identificado mutaciones en *FGF8* y *FGFR1* que causan FLP no sindrómica<sup>36</sup>. El *TGFB3* también ha demostrado estar involucrado en la generación de PF en los seres humanos<sup>37, 38</sup>. Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base de una secuencia génica) de *TGFB3* en población coreana, está relacionado con un aumento del riesgo de FLP hasta 16 veces<sup>39</sup>. Asociaciones alélicas y haplotípicas implican a *TGFB3* en LF con o sin PF en población chilena<sup>38</sup>.

Evidencia originada en ratones muestra que la inactivación condicional de un receptor de TGF $\beta$  (TGF $\beta$ R2) en la población de células de la cresta neural craneal también causa paladar fisurado. Los embriones mutantes muestran asimetría facial, micrognatia, lenguas pequeñas y procesos palatinos que no se elevan sobre la lengua<sup>40</sup>. Estos hallazgos sugieren que TGF $\beta$ R2 juega un papel muy importante en el desarrollo orofacial, requiriéndose más estudios para aclarar su función en el desarrollo normal del paladar.

Recientemente, se ha encontrado que la inactivación del factor de crecimiento BMP7, otro miembro de la familia TGF $\beta$ , causa defectos en el desarrollo de los dientes y fisuras en el paladar blando y duro<sup>41</sup>. Asimismo, existe una asociación entre polimorfismos y mutaciones de BMP4 y FLP<sup>42-44</sup>.

Además de los factores de crecimiento, los factores de transcripción son importantes en el proceso

Vía de señalización	Especie	Resultado
Familia FGF		
<i>Fgf10</i> , <i>Gfr2b</i> , delección	ratón	Paladar fisurado <sup>62</sup>
Familia Hedgehog		
SHH, pérdida señalización	pollo	Paladar fisurado, labio fisurado <sup>63</sup>
SHH, sobreexpresión	ratón	Paladar fisurado <sup>64</sup>
SHH, mutación	humano	Síndrome Gorlin-Goltz, Fisuras <sup>65</sup>
Familia WNT		
WNT, inactivación	ratón	Labio fisurado, con o sin paladar fisurado <sup>66</sup>
<i>Wnt3</i> , mutación	humano	Labio fisurado, con o sin paladar fisurado <sup>67</sup>
Familia TGF $\beta$		
TGF $\beta$ R2, inactivación	ratón	Paladar fisurado, malformación del cráneo <sup>68</sup>
TGF $\beta$ 3, inactivación	ratón	Paladar fisurado <sup>69</sup>
<i>Tgbr2</i> , <i>Tgbr3</i> , mutación	ratón	Paladar fisurado, úvula bífida, craneosinostosis <sup>70</sup>
Familia BMP		
BMP, sobreexpresión	pollo	Labio fisurado <sup>71</sup>

Tabla 1. Vías de señalización y principales componentes implicados en el desarrollo de labio y paladar fisurado.

Etapas de formación	Moléculas y factores involucrados
Crecimiento de las crestas o procesos palatinos desde la cara interna de los procesos maxilares	FGF10, FGFR2b, SHH, MSX1, LHX8, SHOX2, OSR2, <b>Colesterol</b> .
Descenso de la lengua y elevación horizontal de las crestas palatinas sobre la lengua	FGF10, JAG2, NOTCH, TBX22, PAX9, PITX1, OSR2, GABA, <b>Benzodiazepinas</b> .
Crecimiento y aproximación de las crestas palatinas en la línea media	MSX1, LHX8, TGF $\beta$ R2, SHH, HAND2, <b>Fumar</b> , <b>Dioxina</b> .
La fusión de las crestas palatinas y del tabique nasal para formar un paladar secundario continuo	TGF $\beta$ 3, LEF1, SMAD, TWIST, SNAIL, RHO4, IRF6, <b>Virus</b> .

Tabla 2. Factores de crecimiento, transcripción y ambientales (en negrita), que desempeñan un papel en cada etapa del desarrollo del paladar secundario. Modificado de Kouskoura *et al*.

de palatogenesis (Fig. 2 y Tabla 2) y formación del labio. Una variedad de elementos parecen estar implicados en la asociación entre el factor de transcripción *MSX1* y FLP. El mecanismo completo de *MSX1* en el desarrollo de las fisuras orofaciales no se ha dilucidado completamente<sup>45</sup>. En los seres humanos, una mutación sin sentido en *MSX1* fue detectada en pacientes con combinaciones de LF / PF / FLP<sup>46</sup>, lo que representa aproximadamente el 2% de los casos de fisuras no sindrómicas<sup>47</sup>. La ausencia del factor de transcripción *MSX1* causa la falta de desarrollo de las crestas palatinas, lo que conducen a la formación de PF y agenesias dentarias en ratones<sup>48</sup>. En Chile, se determinó que una variación en el locus de *MSX1* es un factor de susceptibilidad ligado a dimorfismo sexual que contribuye al desarrollo de FLP<sup>49</sup>.

Las mutaciones puntuales en *TBX22* (factor de transcripción T-box) se encuentran en 8% de los pacientes paladar fisurado. *TBX22* se expresa en los procesos palatinos en desarrollo y base de la lengua. Un frenillo corto puede ser responsable del movimiento restringido de la lengua, lo que puede ocasionar una elevación incompleta de las crestas palatinas<sup>50</sup>. *IRF6* es otro factor de transcripción implicado en casos no sindrómicos de FLP. *IRF6* se considera un importante gen cuya alteración causa aproximadamente un 12% de LP o fenotipos de FLP<sup>51</sup>.

Previamente se ha establecido la asociación entre la deficiencia de AF y los defectos del tubo neural<sup>22</sup>. La 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) es una importante enzima en la vía de metabolismo del folato. Un SNP, el polimorfismo de *MTHFR*C677T origina una enzima térmicamente inestable y se considera un factor de riesgo para los defectos del tubo neural<sup>52,53</sup>. La presencia de C677T en la madre aumenta el riesgo para FLP en 4,6 veces<sup>54</sup>. En la deficiencia de AF periconcepcional, la variante de *MTHFR* térmicamente lábil, incrementa el riesgo de FLP en 10 veces<sup>55</sup>.

## Discusión.

Actualmente, las anomalías craneofaciales pueden ser detectadas por ecografía a partir de las 16 semanas de desarrollo fetal<sup>56</sup>. En las fisuras orofaciales, relevantes para la odontología clínica, la única terapia disponible para el cierre de las fisuras es la intervención quirúrgica. Sin embargo, la reparación de las fisuras rara vez produce una estética facial ideal<sup>57</sup>, mientras que el crecimiento de la porción superior de la cara es a menudo deficiente<sup>58</sup>.

En Chile, el programa de salud AUGE indica que todo paciente nacido desde el 1 de Julio 2005, con

FLP, este o no asociada a malformaciones craneofaciales, tiene acceso a confirmación diagnóstica y tratamiento, incluyendo rehabilitación en menores de 15 años, con acciones que contemplan la ortopedia pre-quirúrgica y cirugías correctivas (revisar Fisura Labio Palatina en <http://www.supersalud.gob.cl/568/w3-propertyvalue-513.html>).

La identificación de los factores etiológicos de las fisuras orofaciales es el primer paso hacia la prevención primaria. Los factores genéticos que contribuyen a la generación de FLP se han identificado en algunos casos sindrómicos, pero el conocimiento acerca de los factores genéticos que contribuyen a los casos no sindrómicos aún no está claro<sup>59</sup>, y la evidencia está en constante avance.

El conocimiento de las mutaciones genéticas hereditarias que causan FLP permite en examen genético y asesoramiento a los futuros padres, conceptos involucrados en la medicina personalizada<sup>5</sup>.

La terapia con células madre es una posibilidad futura de corrección de FLP antes del nacimiento. Durante la formación de las estructuras orofaciales (5 a 12 semanas de embarazo) el sistema inmune inmaduro del feto permite la introducción de células madre libre de mutaciones. El trasplante e injerto adecuado de células madre podría en principio resultar en la corrección de la malformación<sup>60</sup>. Tecnologías que involucren células madre junto con ingeniería tisular podrían ayudar al cirujano frente a la escasez de tejido<sup>61</sup>.

El desarrollo de nuevas terapias clínicas para detectar anomalías orofaciales, depende en gran medida de un conocimiento detallado de los procesos genéticos implicados en la formación de las estructuras. La investigación en el campo de la biología del desarrollo tiene como objetivo generar beneficios clínicos en el futuro.

Una evaluación exhaustiva de los perfiles genéticos en las mujeres embarazadas puede llegar a ser una medida importante para reducir la morbilidad general de las fisuras orofaciales<sup>12</sup>.

En conclusión, el consumo de tabaco, alcohol y ácido fólico durante el primer trimestre del embarazo parecen ser los factores ambientales más consistentemente relacionados con las fisuras orofaciales. Múltiples genes y vías de señalización han sido implicados con FLP, de ellos, *TGFA*, *FGF8* y *FGFR1*, *TGFB3*, *BMP7*, *MSX1*, *IRF6* han probado estar efectivamente relacionados el desarrollo de fisuras. Pese a la evidencia, se prevé que hay genes adicionales implicados en la etiopatogenia de FLP, los cuales aún no han sido identificados, siendo necesario profundizar los análisis para comprender las vías involucradas en el ensamblaje de la región craneofacial humana.

**Abstract:** Complex genetic process guides the embryonic head development. Alterations in these processes result in structural abnormalities. An example of these are the cleft lip and palate. The major pathways involved in the fissures are families: the Fibroblast Growth Factor (FGF) family, the Hedgehog (HH) family, the Wingless (WNT) family and the Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) family, which includes the Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) and Activins. In this review, we discuss some of the celular/molecular processes and environmental factors involved in the development of the orofacial complex, ending with therapeutic possibilities and potential clinical relevance to the accumulated evidence. **Keywords:** embryonic development, cleft lip, cleft palate, orofacial cleft.

## Referencias.

- 1.- Garland CB, Pomerantz JH. Regenerative strategies for craniofacial disorders. *Front Physiol.* 2012;3.
- 2.- Avery J. Oral development and histology: Thieme; 2001.
- 3.- Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology: with STUDENT CONSULT Online Access: Mosby; 2008.
- 4.- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011;12(3):167-78.
- 5.-Kouskoura T, Fragou N, Alexiou M, John N, Sommer L, Graf D, et al. The genetic basis of craniofacial and dental abnormalities. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2011;121(7-8):636-46.
- 6.-Nanci A. Ten Caté's Oral Histology-E-Book: Development, Structure, and Function: Mosby; 2007.
- 7.- Wilkie AOM, Morriss-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation. *Nature Reviews Genetics.* 2001;2(6):458-68.
- 8.- Cordero DR, Brugmann S, Chu Y, Bajpai R, Jame M, Helms JA. Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. *American Journal of Medical Genetics Part A.* 2011;155(2):270-9.
- 9.- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Widera D. Adult craniofacial stem cells: sources and relation to the neural crest. *Stem Cell Rev.* 2012;8(3):658-71.
- 10.- Minoux M, Rijli FM. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development.* 2010;137(16):2605-21.
- 11.- Santagati F, Rijli FM. Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(10):806-18.
- 12.- Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of nonsyndromic orofacial clefts. *Cleft Palate Craniofac J.* 2012;49(1):73-91.
- 13.- Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: an update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2007;71(10):1509-19.
- 14.- Dabed CC, Cauvi DL. Survey of Dentists' Experience with Cleft Palate Children in Chile. *The Cleft palate-craniofacial journal.* 1998;35(5):430-5.
- 15.- Hodgkinson PD, Brown S, Duncan D, Grant C, McNaughton A, Thomas P, et al. Management of children with cleft lip and palate: a review describing the application of multidisciplinary team working in this condition based upon the experiences of a regional cleft lip and palate centre in the United Kingdom. *Fetal and Maternal Medicine Review.* 2005;16(01):1-27.
- 16.- Wyszynski DF, Wu T. Use of US birth certificate data to estimate the risk of maternal cigarette smoking for oral clefting. *Cleft Palate Craniofac J.* 2002;39(2):188-92.
- 17.- Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk CA, et al. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genet Epidemiol.* 2002;22(1):1-11.
- 18.- Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology.* 1996;54(1):27-33.
- 19.- Shaw GM, Nelson V, Carmichael SL, Lammer EJ, Finnell RH, Rosenquist TH. Maternal periconceptional vitamins: interactions with selected factors and congenital anomalies? *Epidemiology.* 2002;13(6):625-30.
- 20.- Wehby GL, Goco N, Moretti-Ferreira D, Felix T, Richieri-Costa A, Padovani C, et al. Oral cleft prevention program (OCPP). *BMC Pediatr.* 2012;12:184.
- 21.- Tolarova M, Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology.* 1995;51(2):71-8.
- 22.- Castillo C, Tur J, Uauy R. Fortificación de la harina de trigo con ácido fólico en Chile: Consecuencias no intencionadas. *Rev Med Chil.* 2010;138(7):832-40.
- 23.- Cortes F, Mellado C, Pardo RA, Villarroel LA, Hertrampf E. Wheat flour fortification with folic acid: changes in neural tube defects rates in Chile. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(8):1885-90.
- 24.- Lopez-Camelo JS, Orioli IM, da Graca Dutra M, Nazer-Herrera J, Rivera N, Ojeda ME, et al. Reduction of birth prevalence rates of neural tube defects after folic acid fortification in Chile. *Am J Med Genet A.* 2005;135(2):120-5.
- 25.- Nazer H, Cifuentes O, Aguila R, Juárez HM, Cid RM, Godoy VM, et al. Effects of folic acid fortification in the rates of malformations at birth in Chile. *Rev Med Chil.* 2007;135(2):198.
- 26.- Nazer J, Ramirez MC, Cifuentes L. Evolution of prevalence rates of orofacial clefts in a maternity of a Chilean clinical hospital. *Rev Med Chil.* 2010;138(5):567-72.
- 27.- Lopez-Camelo JS, Castilla EE, Orioli IM. Folic acid flour fortification: impact on the frequencies of 52 congenital anomaly types in three South American countries. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(10):2444-58.
- 28.- Baxter H, Fraser FC. The production of congenital defects in the offspring of female mice treated with cortisone. A preliminary report. *McGill Med J.* 1950;19(4):245-9.
- 29.- Carmichael SL, Shaw GM. Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies. *Am J Med Genet.* 1999;86(3):242-4.
- 30.- Park-Wyllie L, Mazzotta P, Pastuszak A, Moretti ME, Beique L, Hunnisett L, et al. Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies. *Teratology.* 2000;62(6):385-92.
- 31.- Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekam RC. *Syndromes of the Head and Neck:* Oxford University Press, USA; 2001.
- 32.- Montenegro MA, Palomino H, Palomino HM. The influence of earthquake-induced stress on human facial clefting and its simulation in mice. *Arch Oral Biol.* 1995;40(1):33-7.
- 33.- Machida J, Yoshiura K, Funkhauser CD, Natsume N, Kawai T, Murray JC. Transforming growth factor-alpha (TGFA): genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only. *Genomics.* 1999;61(3):237-42.
- 34.- Hwang SJ, Beaty TH, Panny SR, Street NA, Joseph JM, Gordon S, et al. Association study of transforming growth factor alpha (TGF alpha) TaqI polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects. *Am J Epidemiol.* 1995;141(7):629-36.
- 35.- Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, et al. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet.* 1996;58(3):551-61.
- 36.- Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, et al. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007;104(11):4512-7.
- 37.- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM,

- Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, et al. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *The American Journal of Human Genetics*. 1998;63(2):557-68.
- 38.- Suazo J, Santos JL, Scapoli L, Jara L, Blanco R. Association Between TGFB3 and Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate in a Chilean Population. *Cleft Palate Craniofac J*. 2010;47(5):513-7.
- 39.- Kim MH, Kim HJ, Choi JY, Nahm DS. Transforming growth factor-beta3 gene SfaN1 polymorphism in Korean nonsyndromic cleft lip and palate patients. *J Biochem Mol Biol*. 2003;36(6):533-7.
- 40.- Wurdak H, Ittner LM, Lang KS, Leveen P, Suter U, Fischer JA, et al. Inactivation of TGFbeta signaling in neural crest stem cells leads to multiple defects reminiscent of DiGeorge syndrome. *Genes Dev*. 2005;19(5):530-5.
- 41.- Zouvelou V, Luder HU, Mitsiadis TA, Graf D. Deletion of BMP7 affects the development of bones, teeth, and other ectodermal appendages of the orofacial complex. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2009;312(4):361-74.
- 42.- Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Association between bone morphogenetic protein 4 gene polymorphisms with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Chilean population. *DNA Cell Biol*. 2010;29(2):59-64.
- 43.- Suzuki S, Marazita ML, Cooper ME, Miwa N, Hing A, Jugessur A, et al. Mutations in BMP4 are associated with subepithelial, microform, and overt cleft lip. *Am J Hum Genet*. 2009;84(3):406-11.
- 44.- Chen Q, Wang H, Hetmanski JB, Zhang T, Ruczinski I, Schwender H, et al. BMP4 was associated with NSCL/P in an Asian population. *PLoS One*. 2012;7(4):e35347.
- 45.- Suazo J, Santos JL, Jara L, Blanco R. Parent-of-origin effects for MSX1 in a Chilean population with nonsyndromic cleft lip/palate. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(8):2011-6.
- 46.- van den Boogaard M, Dorland M, Beemer F, van Amstel H. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nature genetics*. 2000;24(4):342.
- 47.- Jezewski P, Vieira A, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien S, et al. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *Journal of medical genetics*. 2003;40(6):399-407.
- 48.- Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature genetics*. 1994;6(4):348-56.
- 49.- Blanco R, Chakraborty R, Barton SA, Carreno H, Paredes M, Jara L, et al. Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. *Hum Biol*. 2001;73(1):81-9.
- 50.- Kantaputra PN, Paramee M, Kaewkhampa A, Hoshino A, Lees M, McEntagart M, et al. Cleft lip with cleft palate, ankyloglossia, and hypodontia are associated with TBX22 mutations. *J Dent Res*. 2011;90(4):450-5.
- 51.- Zucchero TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, et al. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(8):769-80.
- 52.- van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frans P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*. 1995;346(8982):1070-1.
- 53.- Yan L, Zhao L, Long Y, Zou P, Ji G, Gu A, et al. Association of the maternal MTHFR C677T polymorphism with susceptibility to neural tube defects in offspring: evidence from 25 case-control studies. *PLoS One*. 2012;7(10):e41689.
- 54.- Prescott NJ, Winter RM, Malcolm S. Maternal MTHFR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet*. 2002;39(5):368-9.
- 55.- van Rooij IA, Vermeij-Keers C, Kluijtmans LA, Ocke MC, Zielhuis GA, Goorhuis-Brouwer SM, et al. Does the interaction between maternal folate intake and the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms affect the risk of cleft lip with or without cleft palate? *Am J Epidemiol*. 2003;157(7):583-91.
- 56.- Ghi T, Perolo A, Banzi C, Contratti G, Valeri B, Savelli L, et al. Two-dimensional ultrasound is accurate in the diagnosis of fetal craniofacial malformation. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*. 2002;19(6):543-51.
- 57.- Nollet P, Kuijpers-Jagtman AM, Chatziagianni A, Semb G, Shaw WC, Bronkhorst EM, et al. Nasolabial appearance in unilateral cleft lip, alveolus and palate: a comparison with Eurocleft. *J Craniomaxillofac Surg*. 2007;35(6-7):278.
- 58.- Nollet P, Katsaros C, Huyskens R, Borstlap W, Bronkhorst E, Kuijpers-Jagtman A. Cephalometric evaluation of long-term craniofacial development in unilateral cleft lip and palate patients treated with delayed hard palate closure. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2008;37(2):123-30.
- 59.- Muhamad AH, Azzaldeen A. Genetic of Non-syndromic Cleft Lip and Palate. *Open Access Scientific Reports*. 2012;1:510.
- 60.- Jones NC, Trainor PA. The therapeutic potential of stem cells in the treatment of craniofacial abnormalities. *Expert opinion on biological therapy*. 2004;4(5):645-57.
- 61.- Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Histología y embriología bucodental: [bases estructurales de la patología, el diagnóstico, la terapéutica y la prevención odontológica]1999.
- 62.- Rice R, Spencer-Dene B, Connor EC, Gritli-Linde A, McMahon AP, Dickson C, et al. Disruption of Fgf10/Fgfr2b-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. *J Clin Invest*. 2004;113(12):1692-700.
- 63.- Hu D, Helms JA. The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development*. 1999;126(21):4873-84.
- 64.- Cobourne MT, Xavier GM, Depew M, Hagan L, Sealby J, Webster Z, et al. Sonic hedgehog signalling inhibits palatogenesis and arrests tooth development in a mouse model of the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dev Biol*. 2009;331(1):38-49.
- 65.- Hahn H, Christiansen J, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Chidambaram A, Gerard B, et al. A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem*. 1996;271(21):12125-8.
- 66.- Juriloff DM, Harris MJ, McMahon AP, Carroll TJ, Lidral AC. Wnt9b is the mutated gene involved in multifactorial nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in A/WySn mice, as confirmed by a genetic complementation test. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2006;76(8):574-9.
- 67.- Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, et al. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet*. 2004;74(3):558-63.
- 68.- Wurdak H, Ittner LM, Lang KS, Leveen P, Suter U, Fischer JA, et al. Inactivation of TGFbeta signaling in neural crest stem cells leads to multiple defects reminiscent of DiGeorge syndrome. *Genes & development*. 2005;19(5):530-5.
- 69.- Kaartinen V, Cui XM, Heisterkamp N, Groffen J, Shuler CF. Transforming growth factor-beta3 regulates transdifferentiation of medial edge epithelium during palatal fusion and associated degradation of the basement membrane. *Dev Dyn*. 1997;209(3):255-60.
- 70.- Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet*. 2005;37(3):275-81.
- 71.- Ashique AM, Fu K, Richman JM. Endogenous bone morphogenetic proteins regulate outgrowth and epithelial survival during avian lip fusion. *Development*. 2002;129(19):4647-60.
- 72.- Stoffer J. *Development of the Face and Palate* Baltimore: Indiana University Bloomington; [19-3-2012]. Available from: <http://www.indiana.edu/~anat550/hnanim/face/face.html>.