

Evaluación epidemiológica genética de labio hendido con o sin paladar hendido en genealogías extendidas multigeneracionales pesquisadas en Colombia

Lina Moreno, María Luisa Bravo, Consuelo Valencia, Gustavo Jailler,
Luis Fernando Villegas, Oscar López, Rafael Blanco, Mauricio Arcos-Burgos

Objetivo: discriminar los componentes genéticos y ambientales involucrados en generar la susceptibilidad para labio hendido con o sin paladar hendido (LH+PH) en familias de Antioquia, Colombia y buscar asociación o ligamiento a marcadores genéticos.

Material y método: se seleccionaron 60 individuos afectados de LH+PH y se reconstruyó su genealogía. Al tiempo, se seleccionaron 80 individuos apareados por edad, sexo y condición socioeconómica que sirvieron como controles. Se realizaron análisis de segregación simple, cálculos de heredabilidad, prueba de hipótesis sobre las predicciones del modelo multifactorial, y análisis de asociaciones y ligamiento genético.

Resultados: el análisis de segregación simple mostró un mejor ajuste del modelo de locus mayor recesivo con penetrancia incompleta. La heredabilidad de 96% está de acuerdo con la existencia de un gen mayor. Las pruebas de hipótesis refutaron el modelo de herencia multifactorial. La frecuencia del gen mayor que induce la susceptibilidad para desarrollar LH+PH fue de 0,037. Se encontró covarianza significativa entre el fenotipo LH+PH y el genotipo JKa/JKa (grupo sanguíneo Kidd $p < 0,01$, riesgo relativo=0,2). A partir de este se practicó análisis secuencial de ligamiento entre LH+PH y dicho marcador en una familia extendida multigeneracional que no mostró resultados concluyentes.

Conclusiones: los hallazgos sugieren que los efectos ambientales son mínimos en la susceptibilidad a desarrollar LH+PH y es más importante el efecto de un gen mayor.

Introducción

El labio hendido (LH) con o sin paladar hendido (PH): (LH±PH), es una malformación congénita que ha acompañado a la humanidad desde sus orígenes. Representa 60% de todas las malformaciones del tracto gastrointestinal, y es la segunda de todas las malformaciones congénitas (1).

Varios estudios han mostrado la existencia de diversos factores ambientales que podrían explicar el desarrollo de LH±PH. La gran mayoría de ellos cursan con alteraciones sindrómicas y obligan, por lo tanto, a un diagnóstico certero con la finalidad de obviar falsas apreciaciones debidas a heterogeneidad genética. Entre

Dres. Lina Moreno, Consuelo Valencia, Gustavo Jailler, Luis Fernando Villegas, Oscar López: Programa General de Labio Hendido y paladar hendido. Clínica Noel; Dra. María Luisa Bravo: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Colombia; Dr. Rafael Blanco: Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile; Dr. Mauricio Arcos-Burgos: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Instituto Neurológico de Antioquia, Medellín, Colombia.

estos factores se puede mencionar la rubéola (2), el virus de la influenza A2 (3), el uso de difenilhidantoinato sódico (4) y de tranquilizantes menores (5).

Por otro lado, el LH±PH acompaña a más de un centenar de anomalías cromosómicas (6) y a un gran número de alteraciones sindrómicas (7). También se ha descrito susceptibilidad (genes mayores específicos) para la génesis de paladar hendido cuando existe exposición a glucocorticoides en el primer trimestre del embarazo (8). Debe mencionarse, igualmente, que la incidencia de LH±PH varía en orden descendente cuando se toma como variable de comparación la raza; así, el orden de incidencia en los diferentes grupos étnicos es el siguiente: mongoloïdes (incluidos en este grupo los amerindios) > caucasoïdes > negroides; con las siguientes cifras de incidencia: 1,93/1000 > 1,25/1000 > 0,46/1000 respectivamente (9). Por último, los estudios en gemelos han mostrado una alta concordancia en la existencia de la malformación entre gemelos mono-zigóticos que cuando se compara con la concordancia encontrada en gemelos dizigóticos (10). Todos estos aspectos, sugieren la existencia de un componente genético en la etiología de la entidad.

Para explicar la agregación familiar de LH±PH se han propuesto diferentes formas de transmisión. El modelo más clásico es el de Falconer, en el cual la susceptibilidad es una variable continua que se distribuye normalmente y sólo aparece el fenotipo afectado cuando la susceptibilidad llega a ciertos umbrales de riesgo (11). Este mo-

delo de transmisión se denomina modelo del umbral multifactorial y en el se acopla a los efectos ambientales y a los efectos genéticos. Así pues, ellos interactúan sumatoriamente y al final aparece como resultado un fenotipo particular. Los estudios actuales han propuesto el modelo de locus mayor, con el inconveniente de que diferentes poblaciones presentan ajuste diferencial a varios modelos como el de herencia recesivo, el de herencia dominante e incluso el codominante (12). También se ha intentado determinar la localización de este locus mayor, mediante el uso de mapeo por ligamiento a genes candidatos como por ejemplo: los factores de crecimiento (asociación significativa a un RFLP del gen del factor de crecimiento transformante epidérmico, localizado en el cromosoma 2 (13), al gen (F13A) en el 6p (14), al gen BCL3 en el cromosoma 19 (15, 16), a ENDI 1 (17), al gen D4S192 en el cromosoma 4q (18), al factor de crecimiento transformante alfa (TGFA) (19, 20), al gen para el receptor alfa del ácido retinoico (RARα gene) en el 17q (21), al *homebox 7* (MSX1) (20) y al factor de crecimiento transformante β2 (20). Sin embargo, los resultados de ligamiento para estos genes, utilizando diferentes poblaciones no han sido concluyentes.

De este modo, es evidente que existen resultados contradictorios con relación al tipo de modelo que se adapta a la susceptibilidad hereditaria para el desarrollo de LH±PH. Por ello, el objetivo de esta investigación, es determinar el aporte genético en la aparición de LH±PH, utilizando técnicas de epidemiología

genética. Así mismo, discriminar que modelo de herencia se adapta mejor a las genealogías trazadas en una población nuestra, y por último, determinar asociaciones eventuales y ligamiento de la entidad a marcadores genéticos.

Material y métodos

Mediante una estrategia de muestreo fijo, se estudiaron 60 pacientes de la Clínica Noel de Medellín, afectados de LH+PH que fueron analizados y aleatorizados de acuerdo con el orden de llegada. Nosotros suponemos que dos individuos que llegan consecutivamente a la clínica son independientes y bajo este supuesto el orden de llegada a la clínica es un buen generador de una muestra aleatoria de afectados de LH+PH en el departamento de Antioquia. La edad de estos casos índice estuvo comprendida entre los 0 y los 14 años. Paralelamente, se estudiaron 80 niños con edades entre 0 y 14 años, entre los que llegan a la misma clínica para atención médica, sin sufrir ni tener antecedentes de LH±PH, y que en adelante denominaremos controles.

Cada individuo afectado de LH+PH, en primera instancia, fue evaluado por el equipo de cirugía plástica y de ortodoncia, pertenecientes al programa de la clínica y luego remitido a examen de genética. Este consistió en un análisis clínico con la finalidad de descartar entidades sindrómicas. No se practicaron pruebas de coeficiente intelectual ni se realizó cariotipificación. En las familias con más de un afectado en la misma hermandad, o en diferentes hermandades conectadas por algún relacionado biológico al caso índice, se verificó la in-

formación mediante trabajo de campo. A los casos índices y a los padres se les tomó una muestra sanguínea de 3 cc. En las visitas domiciliarias se tomó muestra sanguínea a los familiares disponibles. Posteriormente se determinaron los genotipos para los sistemas eritrocitarios ABO, Rh-Hr, MNSs, Kell y Kidd, de acuerdo con la metodología de Sussman (22).

El análisis de segregación se realizó según la teoría descrita por Morton para modelos de segregación simple (23). La contrastación del modelo multifactorial de Falconer fue realizada según la metodología descrita por Marazita (12). Se determinó la incidencia de afectados en los relacionados biológicos en primer grado (hermanos y padres) y segundo grado (abuelos y tíos). Se calculó, así mismo, la heredabilidad, h^2 , según el modelo de Falconer (11). El análisis de asociaciones se hizo de acuerdo con un modelo de contingencia según la distribución de X^2 y considerando la prueba exacta de Fisher, que es recomendada para muestras pequeñas. El análisis de ligamiento se realizó mediante el método secuencial de ligamiento (LOD SCORE), creado por Morton (24) mediante el uso del programa sistematizado LIPED. De los 60 afectados analizados, cinco fueron excluidos debido a que la evaluación clínica mostró que presentaban un cuadro sindrómico.

Resultados

Las variables demográficas se describen mediante distribuciones porcentuales en las Tablas 1-3. En los 30 casos en que se detectó agregación familiar fue posible trazar genealogías com-

pletas de 22. Sólo se muestran cuatro de estas genealogías (Figuras 1 a 4). En ellas se definieron 46 hermandades con un total de 219 individuos, entre los cuales existieron 54 afectados. En la Tabla 4 se muestran los cálculos para el análisis de segregación simple, bajo el supuesto de una frecuencia de segregación (p)= 0,25, es decir segregación recesiva. El valor esperado de afectados para $p=0,25$ es aproximadamente 4 DS mayor que el encontrado. Cuando se asume $p=0,50$ (herencia dominante), el número de individuos esperados se aleja aproximadamente 10 DS.

Se encontraron 11 afectados en 120 relacionados biológicos de primer grado (padres y hermanos) del caso índice (0,09166) y seis afectados en 236 relacionados biológicos de segundo grado (abuelos, tíos) del caso índice (0,02500). El estimado de la heredabilidad, a partir de estos resultados de incidencia es de 96,15 (SE=7,98).

Se encontró asociación significativa sólo para el genotipo JKa/JKa del grupo sanguíneo Kidd ($p<0,01$). La búsqueda de un posible ligamiento para este grupo sanguíneo y LH±PH, utilizando modelo de herencia recesivo con penetrancia incompleta, y considerando, además, igual fracción de recombinación masculina y femenina, mostró un resultado de LOD SCORE de -1.

Discusión

La incidencia de LH±PH en Antioquia según estimados obtenidos en los archivos del Hospital General de Medellín (25), y de informaciones verbales suministradas por personal perteneciente a programas especiales del

	No.	%
Según la forma		
I-LH±PH	49	89,09
A-LH Unilateral	38	77,55
1-LH Unilateral der	18	36,73
2-LH Unilateral izq	20	40,81
B-LH Bilateral	11	22,44
II-PH	6	10,91
Según la intensidad		
I-LH±PH	37	75,50
II-LH±PH	12	20,40

Tabla 1. Distribución de la forma e intensidad de LH±PH en 55 casos seleccionados en la población de Antioquia.

	No.	%
I- Existencia de agregación familiar	31	54
II-No existencia de agregación familiar	24	46
Total	55	100

Agregación familiar: antecedentes de afectados vía paterna, vía materna, vía paterna y materna, antecedentes de uniones consanguíneas, antecedentes de uniones consanguíneas mas antecedentes de afectados.

Tabla 2. Distribución según existencia o no de agregación familiar en pacientes afectados con LH±PH.

	No	%
I-LH±PH	26	53,00
A-LH±PH	21	80,66
1-R.B. Afect vía materna	6	28,00
2-R.B. Afect vía paterna	5	23,00
3-R.B. Afect vía pater y mater	3	14,00
4-R.B. Afect más endog parental	3	14,00
5-Hermanos afectados	2	9,00
6-Endogamia Parental	2	9,00
B-LH±PH	5	19,34
1-R.B. Afect vía materna	2	40,00
2-R.B. Afect más endog parental	2	40,00
3-Endogamia parental	1	20,00

* R.B.=Relacionados Biológicos

Tabla 3. Distribución según forma de afección en pacientes de LH±PH con antecedentes del cuadro a nivel familiar (agregación familiar).

Epidemiología del labio hendid

Número de individuos afectados				
S	nS	Obs	Esp	Var
2	7	7	7,9996	0,85715
3	14	15	18,162	3,68168
4	10	12	14,628	4,20050
6	6	6	10,948	4,65570
7	1	1	2,0196	0,97024
8	2	3	4,4450	2,34480
10	2	3	5,2980	3,18340
11	1	2	2,8710	1,80530
12	1	3	3,0980	2,01960
13	1	1	3,3290	2,23350
19	1	1	4,7700	3,48140
Total	46	54	77,569	29,4331

D. S= 29,4331 = 5,4252
P: Frecuencia o proporción de segregación mendeliana
S: Tamaño de la hermandad
nS: Número de hermandades de tamaños

Tabla 4. Análisis de segregación utilizando modelo recesivo y dominante para familias nucleares afectadas de LH±PH, seleccionadas a partir de casos índice.

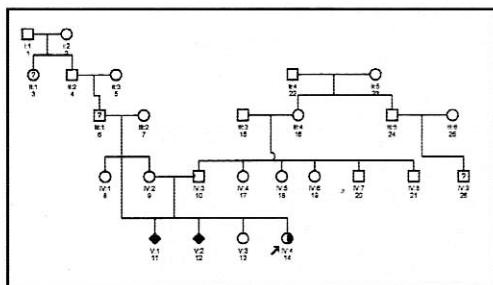


Figura 1. Labio y paladar hendidos. Familia: CP.

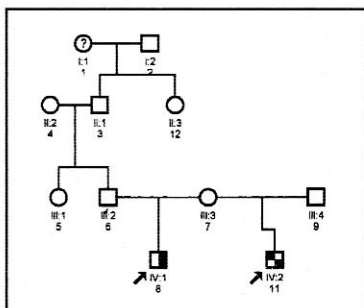


Figura 2. Labio y paladar hendidos. Familia: DR.

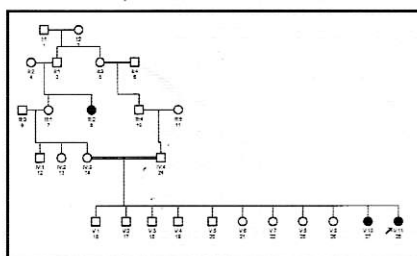


Figura 3. Labio y paladar hendidos. Familia: VH.

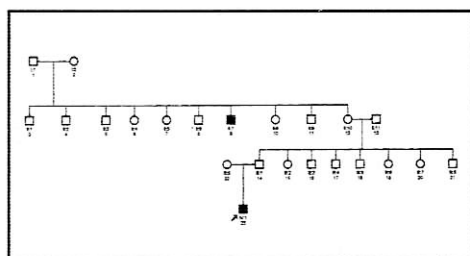


Figura 4. Labio y paladar hendidos. Familia: AH.

Servicio Seccional de Salud del Departamento, es de aproximadamente un afectado por cada 1000 nacimientos. Esta frecuencia es mayor que la estimada en otras poblaciones, en donde ha sido calculada como del orden de un afectado por cada 1500 a 3000 individuos (26). En este estudio la distribución por género no muestra variaciones significativas. Se observó una proporción aproximada de 1:1. Este resultado no concuerda con lo encontrado en algunos estudios epidemiológicos genéticos que han descrito una proporción de

dos varones por cada mujer (27). Tampoco encontramos relación entre grado de severidad del síndrome y el sexo masculino como lo han informado otros autores (27). Los anteriores hallazgos podrían indicar una conducta inusual en la distribución y manifestación de LH+PH para la población de Antioquia, que podría estar relacionada a la estructura genética de esta población o consistente con la existencia de heterogeneidad en el desarrollo de la malformación. Encontramos agregación familiar en 54% de los casos, representada en: antecedentes de afectados vía paterna, materna, o ambos, antecedentes de uniones consanguíneas, y antecedentes tanto de consanguinidad como de relacionados biológicos afectados. Lo anterior fortalece la hipótesis de intervención de factores genéticos en la aparición del fenotipo LH±PH. El análisis para el modelo de herencia multifactorial reportó una heredabilidad de 96%. Este estimativo es altamente semejante con el encontrado por Chung de 99% (9) y por Hecht de 93% (27). Este último hallazgo está de acuerdo con lo predicho por Morton para la existencia de genes mayores. Altos resultados de heredabilidad, cercanos a uno son muy sugestivos de la presencia de genes mayores (26). Para contrastar la verosimilitud del modelo multifactorial, utilizamos pruebas de ajuste de los resultados obtenidos contra los esperados de acuerdo con las tesis extrapolables a partir del modelo del umbral multifactorial de Falconer (11). Estas tesis están bien descritas por Marazita (12) y son: 1) La incidencia en relacionados biológicos se espera que caiga desde el primero al segun-

do grado de coancestría. 2) Los relacionados biológicos en primer grado del sexo menos afectado, se espera que tengan un riesgo más alto, que los relacionados biológicos en primer grado del sexo más afectado 3) La heredabilidad no debe ser mayor de 75%, resultados cercanos o mayores de 100% son incompatibles con el modelo y 4) La consanguinidad no debe ser mayor que la existente en la población general. Debe observarse que las tesis extrapolables que pueden someterse a prueba en este trabajo son la primera y tercera.

La segunda tesis no puede contrastarse, puesto que no se encontraron distorsiones de la distribución por géneros. Igualmente la cuarta tesis tampoco puede contrastarse puesto que hasta el día de hoy no se conoce el coeficiente de endogamia que existe en la población de Antioquia. Con relación a la tercera tesis los resultados de alta heredabilidad obtenidos en nuestro trabajo son incompatibles con el modelo multifactorial y, como consecuencia, lo hacen falible. Según la teoría Popperiana de la contrastación, con una sola contrastación incompatible, el modelo debe descartarse y se debe considerar otro que explique los resultados donde el falló (28).

El análisis de segregación para la hipótesis de locus mayor, mostró que nuestros resultados se adaptan mejor al modelo recesivo con penetrancia incompleta $P=0,25$ (proporción según modelo recesivo). No obstante, como se puede observar, la segregación de nuestros resultados se aleja más de 2DS de lo esperado (Tabla 4). Compárense individuos afectados esperados y casos afectados). Lo anterior puede acep-

tarse si asumimos una penetrancia reducida (73%). Estos hallazgos son compatibles con los encontrados por Chung et al. (9) y Marazita et al., (12). No obstante, los anteriores resultados son incompatibles con los resultados encontrados por Hecht, quien ha demostrado que sus genealogías se ajustan mejor al modelo dominante con una penetrancia muy reducida para LH±PH. 20% (20). Pensamos que estos resultados, aparentemente incompatibles, coinciden en varios puntos: la acción de un gen mayor, un pequeño efecto medioambiental y penetrancia incompleta. Derivamos estas diferencias de penetrancia, en función de la existencia de variaciones de la expresividad para la entidad, lo que repercute en una apreciación subjetiva de penetrancia incompleta. En otras palabras, existe una mala clasificación de individuos afectados que presentan microformas de la entidad (ausencia de incisivos laterales, por ejemplo). En relación con lo anterior, debe mencionarse que existen criterios encontrados. Por ejemplo, Woolf demostró que el incisivo lateral, anómalo ó agenésico, se encuentra con una incidencia igual, tanto en la población general como en la población de relacionados biológicos de afectados son LH+PH (29). Nosotros no pudimos encontrar estudios posteriores relacionados con la existencia de alteraciones en incisivos superiores. Crawford encontró que la asimetría del primer molar, asociada a presencia de asimetría en los dermatoglifos, constituye un criterio de predisposición individual, para el desarrollo de LH±PH en la descendencia (30).

Así mismo, Kurisu y col, reportaron la tendencia a hipertelismo familiar como un indicador de predisposición en genealogías afectadas de LH+PH (31). Otro aspecto que puede corroborar nuestra hipótesis de recesividad, tiene que ver con la observación empírica de los árboles genealógicos en los que se presenta un alto coeficiente de endogamia.

Asumiendo el modelo de locus mayor recesivo y penetrancia completa, se calculó la frecuencia del gen anormal para esta población en 0,037. Esto permite determinar exactamente las probabilidades de afección de un próximo descendiente, en una familia con riesgo, sin utilizar el riesgo empírico establecido por el modelo multifactorial.

La asociación significativa al genotipo JKa/JKa ($p \leq 0,01$) del grupo sanguíneo Kidd, con un riesgo relativo $RR=0,20$ y una fracción etiológica (FA) igual a - 0,32, catalogan a JKa/JKa como un protector para el desarrollo de la entidad. Hasta ahora, no se han detectado asociaciones significantes para el cromosoma 18. Este hallazgo debe corroborarse posteriormente mediante el uso de más familias en el análisis de ligamiento, porque los resultados de LOD SCORE que se obtuvieron, no descartan ni confirman ligamiento a este grupo sanguíneo. En un estudio de ligamiento a otros genes candidatos (TGFB2, MSX1, TGFB3, TGF α) en una población finlandesa (20), no pudo encontrarse asociación con variantes alélicas previamente informadas para ninguno de estos genes. Así mismo Scapoli (32) no pudo encontrar asociación entre el TGF α polimorfismo Taq I y labio hen-

Epidemiología del labio hendido

dido con o sin paladar hendido en 40 familias italianas utilizando desequilibrio de ligamiento. Esto comparado con otros estudios que utilizaron poblaciones caucásicas en donde si se ha encontrado mayor asociación con el TGF α , sugiere la existencia de diferentes factores etiológicos genéticos y/o ambientales entre distintas poblaciones.

Agradecimientos

Queremos agradecer a las familias que colaboraron para la realización de este estudio. Mauricio Arcos-Burgos fue financiado por Colciencias y por el ICI becas Mutis durante el desarrollo de su PhD. Este trabajo fue posible gracias a la colaboración de la Clínica Noel de Medellín y su grupo de LH \pm PH.

Summary

A genetic epidemiological analysis of cleft lip with or without cleft palate (CL \pm CP) in antioquian population (Colombia) is presented. The segregation analysis is more in agreement with a recessive major locus model with incomplete penetrance. An heredability of 96%, was not in agreement with the multifactorial threshold model and supported the major gene model. The frequency of the abnormal gene at recessivity and incomplete penetrance is 0.037 for the antioquian population. The blood group Kidd showed association with CL \pm CP (Pc)=0.01 and its relative risk (RR)=0.2 is consistent with protection for developing CL \pm CP. In five families, we found a LOD SCORE of-1.

Bibliografía

1. **Juy RH.** Congenital anomalies as recorded on birth certificates in the division of vital statistics of the Pennsylvania Department of Health for period 1956-1960. *Plast Reconstr Surg* 1963; **32**: 361-367
2. **Ingalls TH, Taube TE, Klingberg RA.** Cleft lip and palate: Epidemiologic considerations. *Plast Reconstr Surg* 1964; **34**: 1-10
3. **Leck I, Hay S, Witte JJ, Greene JC.** Malformations recorded on birth certificates following A2 influenza epidemics. *Public Health Rep* 1969; **84**: 971-979
4. **Pashayan H, Pruzansky D, Pruzansky S.** Are anticonvulsants teratogenic? *Lancet* 1971; **2**: 702-703
5. **Safra M, Oakley GP.** Association between cleft lip with or without cleft palate and prenatal exposure to diazepam. *Lancet* 1975; **2**: 478-540
6. **Schinzel A.** Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. Waite de Gruyter, New York, 1984.
7. **McKusick VA.** Mendelian inheritance in man. Sixth edition, Baltimore and London: The Johns Hopkins University press. 1983
8. **Trasler DG, Fraser FC.** Time-position relationships with particular reference to cleft lip and cleft palate. In: Wilson JG, Frase FC, eds. Handbook of teratology Vol 2. New York: Plenum 1977.
9. **Chung CS, Ching GHS, Morton NE.** A genetic Study of Cleft Lip and Palate in Hawaii. E. Complex Segregation Analysis and Genetic Risks. *Am J Hum Genet* 1974; **26**: 177-188.
10. **Metrakos JD, Metrakos K, Baxter H.** Clefts of the lip and palate in twins. *Plast Reconstr Surg* 1958; **22**: 109-122.
11. **Falconer DS.** The inheritance of liability to certain diseases estimated from the incidence in relatives. *Ann Hum Genet* 1965; **29**: 51-71.
12. **Marazita ML, Goldstein AM, Smaley SL, Spence MA.** Cleft Lip With or Without Cleft Palate: Reanalysis of a three-Generation family Study From England. *Genetic Epidemiology* 1986; **3**: 335-342.
13. **Ardinger HH, Buetow KH, Bell IG, Bardach J, Van-Demark DR, Murray CJ.** Association of genetic variation of the Transforming Growth factor- α Gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: 348-353.
14. **Eiberg H, Bixler D, Nielsen LS, Conneally PM, Mohr J.** Suggestion of linkage of a major locus for nonsyndromic orofacial cleft with F13A and tentative assignment to chromosome 6. *Clin Genet* 1987; **2**: 129-132.
15. **Stein J, Mulliken JB, Stal S, Gasser DL, Malcolm S, Winter R, Blanton SH, et al.** Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to BCL3 in 17 multigenerational families. *Am J Hum Genet* 1995; **57**: 257-272.
16. **Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynski DF, et al.** Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral cleft: including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet* 1997; **73(3)**: 337-344.
17. **Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, et al.** Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient endothelin-1. *Nature* 1994; **368**: 703-710.
18. **Healey SC, Mitchell LE, Chevenix-Trench G.** Evidence for an association between non-syndromic cleft lip with or without cleft palate and a gene located on the long arm of chromosome 4. *Am J Hum Genet* 1994; **55**: A47.
19. **Chenevis-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG.** Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *Am J Hum Genet* 1992; **51**: 1377-1385.
20. **Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart AM, Schearer H, Shiang R, et al.** Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in Philippines. *Cleft Palate Craniofac J* 1997; **34(1)**: 1-6.
21. **Hecht JT, Wang GY, Blanton H, et al.** Cleft Lip and Palate: No Evidence of Linkage to transforming Growth Factor Alpha. *Am J Hum J Genet* 1991; **49**: 682-686.
22. **Sussman LN.** Patternity by blood grouping. Springfield: CT Publishers, 1976.
23. **Morton NE.** Genetic Test under incomplete ascertainment. *Am J Hum Genet* 1959; **11**: 1-16.
24. **Morton NE.** Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 1955; **7**: 277-318.
25. **López JB, Bravo MLJ.** Incidencia de Labio Hendido con o sin Paladar hendido en el Hospital General de Medellín. Biblioteca del Hospital General de Medellín 1989.
26. **Morton NE, Chung CS, Mi MP.** Genetics of interracial crosses in Hawaii. Basel: S. Karger, Morton NE. Maclean CJ. Lew R, Yee S. Hawaii 1967.
27. **Hecht JT.** Dominant CLP families. *J Med Genet* 1990; **27**: 597.
28. **Popper KR.** Realismo y el Objetivo de la ciencia. Post Scriptum a la lógica de la investigación científica. Vol I Edición preparada por WW. Bartley III. Mexico: Editorial Tecnos. S.A. 25-26.
29. **Wolf B.** On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955; **19**: 251 -253.
30. **Crawford FC, Sofaer JA.** Cleft lip with or without cleft palate: Identification of sporadic cases with a high level of genetic predisposition. *J Med Genet.* 1987; **24**: 163-169.
31. **Kurusu K, Niswander JD, Johnston MC, Mazaheri M.** Facial morphology as an Indicator of Genetic Predisposition to Cleft Lip and Palate. *Am J Hum Genet* 1974; **26**: 702-714.
32. **Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Martinelli M, et al.** Lack of linkage disequilibrium between transforming growth factor alpha Taq I polymorphism and cleft lip with or without cleft palate in families from Northeastern Italy, 1998.