



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Risco de fenda labial não sindrômica com ou sem fenda palatina e polimorfismo *Vax1* rs7078160 em indivíduos da etnia Han do sul da China[☆]

Qian Wang ^{a,b}, Sichao Sun ^c, Qinggao Song ^c, Huan Hu ^{a,b}, Jiaxing An ^d
e Jianguo Liu ^{a,c,*}

^a Oral Disease Research Key Laboratory of Guizhou Tertiary Institution, School of Life Science, Zunyi Medical University, Zunyi, China

^b Microbial Resources and Drug Development Key Laboratory of Guizhou Tertiary Institution, School of Life Science, Zunyi Medical University, Zunyi, China

^c School of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi, China

^d Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, China

Recebido em 3 de junho de 2020; aceito em 28 de agosto de 2020

PALAVRAS-CHAVE

Fenda labial;
Fenda palatina;
Polimorfismos de
nucleotídeo único;
Vax1;
rs7078160

Resumo

Introdução: A fenda labial não sindrômica, com ou sem fenda palatina, é um defeito congênito comum em todo o mundo, devido a uma combinação de fatores ambientais e genéticos. O *genome-wide association studies* relatou que o polimorfismo rs7078160 do *Vax1* está intimamente relacionado à fenda labial não sindrômica, com ou sem fenda palatina em populações europeias. Estudos subsequentes mostraram os mesmos resultados nas populações mongol, japonesa, filipina e vietnamita etc. No entanto, pesquisas conflitantes foram relatadas na população chinesa.

Objetivo: Investigar a associação entre o polimorfismo rs7078160 e fenda labial não sindrômica, com ou sem fenda palatina, em pacientes do sul da China.

Método: Tentamos investigar a distribuição do polimorfismo rs7078160 em 100 trios completos de pacientes (39 pacientes com fenda labial e palatina não sindrômica; 36 pacientes com fenda labial somente, não sindrômica; 25 com fenda palatina somente, não sindrômica e seus pais), da etnia Han do sul da China, e em 60 trios saudáveis selecionados como controle. Reação de polimerase em cadeia e o sequenciamento de Sanger foram usados para genotipar o polimorfismo rs7078160 do *Vax1* e tanto os casos-controle quanto as associações baseadas na família foram analisadas.

Resultados: As análises de caso-controle revelaram que o polimorfismo rs7078160 estava significativamente associado a fenda labial não sindrômica, com ou sem fenda palatina ($p=0,04$) e fenda labial e palatina não sindrômica ($p=0,01$), mas não estava associado a pacientes com

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2020.08.007>

[☆] Como citar este artigo: Wang Q, Sun S, Song Q, Hu H, An J, Liu J. The risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and *Vax1* rs7078160 polymorphisms in southern Han Chinese. Braz J Otorhinolaryngol. 2021;87:718-22.

* Autor para correspondência.

E-mail: jgl_zmu@126.com (J. Liu).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

2530-0539/© 2021 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

fenda labial somente não síndrome e fenda palatina somente não síndrome. A composição do genótipo de rs7078160 compreende AA homozigoto mutado, AG heterozigoto e GG homozigoto selvagem. Casos com genótipos AG + AA comparados com GG homozigotos mostraram um risco aumentado de fenda labial não síndrome, com ou sem fenda palatina ($p=0,04$, OR = 2,05, IC de 95%: 1,01 – 4,16) e fenda labial e palatina não síndrome ($p=0,01$, OR = 3,94, IC 95%: 1,34-11,54). Além disso, não detectamos desequilíbrio de transmissão em rs7078160 ($p=0,68$). **Conclusão:** Este estudo sugere que o polimorfismo rs7078160 foi um fator de risco para fenda labial não síndrome, com ou sem fenda palatina, e o gene *Vax1* está fortemente associado com fenda labial não síndrome, com ou sem fenda palatina em populações da etnia Han do sul da China.

© 2021 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

A fenda labial não síndrome com ou sem fenda palatina (FLNS/P) é uma das malformações congênitas mais comuns em todo o mundo, com uma incidência de 1,2 em 1.000 nascidos vivos.¹ Na China, a prevalência de FLNS/P é maior do que em outras populações étnicas (1,48 a 3,27 em 1.000 nascidos vivos).^{2,3} Atualmente, com o desenvolvimento da cirurgia plástica, mais pacientes com fenda labial ou palatina podem ser submetidos ao reparo cirúrgico;⁴ no entanto, eles ainda podem apresentar uma série de problemas, como deformação craniofacial e de fala. Além disso, embora instituições de caridade internacionais como a *Smile Train* tenham fornecido suporte para muitos pacientes, o tratamento da FLNS/P pode representar um custo econômico pesado para algumas famílias, especialmente nos países em desenvolvimento. Portanto, esclarecer as etiologias da FLNS/P é muito importante para o diagnóstico e a prevenção da doença.

As etiologias e a patogênese da FLNS/P são complexas, incluem fatores genéticos e ambientais ou uma combinação dos mesmos.³ Nos últimos anos, com o desenvolvimento de alta tecnologia de sequenciamento e metodologia estatística, o estudo de associação ampla do genoma (GWAS) foi feito para identificar genes candidatos envolvidos no desenvolvimento de FLNS/P.⁵ As evidências do GWAS identificaram dezenas de *loci* e genes causadores potenciais de FLNS/P, como o *Irf6*, *Mafb*, *Grhl3*, *Abca4*, *Nog*, *Spry2*, *Tpm1*, 8q21.3, *Crebbp* e *Vax1*.^{6–10} Entretanto, nas subseqüentes reproduções, poucos desses *loci*/genes mostraram correlações consistentemente positivas em todos os estudos. Na verdade, para mais genes candidatos, resultados inconsistentes foram relatados em populações de diferentes etnias e regiões. *Vax1* é um desses genes.

Um GWAS conduzido por Mangold et al. identificou um novo *loci*, rs7078160, associado a FLNS/P em 10q25 na população europeia.¹¹ Posteriormente, Beaty et al. conduziram outro estudo GWAS em grupos europeus e asiáticos e seus achados confirmaram que o polimorfismo rs7078160 do *Vax1* estava correlacionado com FLNS/P.⁶ Subseqüentemente, estudos feitos em populações de mongóis, japoneses, filipinos e vietnamitas apoiaram os resultados acima.^{12–14} No entanto, pesquisas conflitantes foram relatadas na população chinesa e um estudo de Li et al. descobriu

que rs7078160 do *Vax1* não estava associado a FLNS/P na população da etnia Han do norte da China.¹⁵ Neste estudo, primeiramente investigamos a correlação entre os polimorfismos do *Vax1* rs7078160 e o risco de FLNS/P na população de etnia Han do sul da China. Considerando que as amostras de trio completo podem fornecer dados mais confiáveis do que as amostras de caso-controle, o desenho de caso-controle-pais foi usado neste estudo, para que pudéssemos detectar as distribuições genotípicas e alélicas do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) alvo enquanto analisamos os efeitos de origem parental.

Método

Amostra

O estudo foi conduzido no departamento de cirurgia oral e maxilofacial afiliado ao *Stomatological Hospital of Zunyi Medical University* (Zunyi, China) de 2016 a 2019. Cem pacientes FLNS/P (39 pacientes com fenda labial e palatina não síndrome, FLPNS; 36 pacientes com fenda labial não síndrome, FLNS; e 25 com fenda palatina não síndrome, FPNS) e seus pais foram recrutados para serem avaliados no estudo. Sessenta trios saudáveis pareados foram selecionados como controle. O protocolo do estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da *Zunyi Medical University* (ZMU-HG1/Set 25/16 data: 01/11/2016). O termo de consentimento livre e informado foi obtido dos pais ou outros responsáveis legais.

A avaliação clínica foi conduzida por cirurgiões orais e maxilofaciais experientes, para excluir os pacientes com FL/P síndrome associados a qualquer outra deficiência congênita. Todos os casos de FLPNS, FLNS e FPNS eram unilaterais e nenhum dos pacientes tinha parentes afetados; pacientes com histórico familiar de doença genética também foram excluídos. Voluntários saudáveis sem histórico familiar de fenda labial e/ou palatina ou outra anormalidade foram escolhidos como controles. Todos os casos e controles eram da população chinesa de etnia Han, com a mesma distribuição de idade e gênero, e viviam no sul da China havia pelo menos três gerações. Três ml de sangue venoso

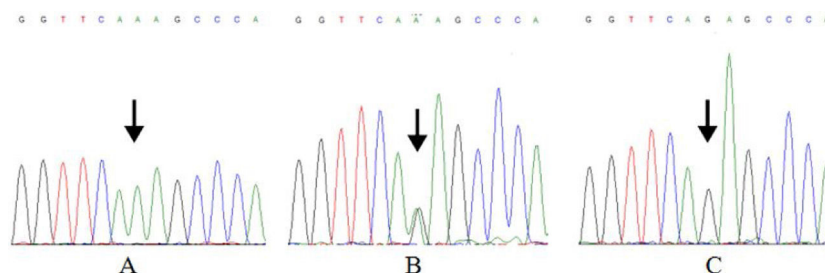


Figura 1 Resultados do sequenciamento de DNA do polimorfismo rs7078160. (A) Genótipo homozigoto AA mutado. (B) Genótipo heterozigoto AG. (C) Genótipo homozigoto GG selvagem.

periférico foram coletados de cada indivíduo e armazenados a -80°C .

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento por PCR

O DNA genômico foi extraído da amostra de sangue com o kit TIANamp Blood DNA (Tiagen Biotech, Pequim, China). Os *primers* específicos de rs7078160 foram projetados de acordo com as sequências de referência do *Vax1* no NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, EUA) pelo *software* Primer 5.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, EUA). A sequência do primer *forward* foi 5' TGGGAAGTGGGTGAGATGGA 3', enquanto o primer reverso foi 5' ATTGGGCGGACCCAGTAAAG 3'. Todas as amplificações de PCR foram feitas em um termociclador Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A mistura de reação consistiu em 10–30 ng de DNA genômico, 1 μL de cada primer (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$), 4 μL de dNTPs (2,5 mmol L^{-1} de cada nucleobase), 5 μL 10 $\times$ de Tampão (com MgCl_2) e 1,0U de Taq polimerase (TaKaRa, Dalian, China), adicionando-se ddH_2O a um volume de 50 μL . A sequência de amplificação por PCR foi: 1) Desnaturação (94°C , 4 min); 2) 34 ciclos incluindo desnaturação (94°C , 30s), *annealing* (58°C , 30s), extensão (72°C , 40s), 3) e Extensão final (72°C , 5 min). Os produtos de PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose e purificados. O sequenciamento foi feito pelo BGI (Beijing Genomics Institute, Pequim, China). Alinhamos e editamos sequências com o *software* de sequenciamento de DNA Chromas 2.6.6 (Technelysium, Queensland, Austrália) e MEGA X.¹⁶ Os resultados do sequenciamento de DNA de rs7078160 são mostrados na [figura 1](#).

Métodos estatísticos

O frequências de genótipo e alélicas foram resumidos nos casos (grupo total, FLPNS e subgrupos FLNS e FPNS) e nos controles. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) afirma que ambas as frequências de alelos e genótipos em uma população de acasalamento aleatório permanecem constantes. Com o intuito de demonstrar a estabilidade genética de nossos indivíduos, o EHW foi avaliado de acordo com a frequência do genótipo. Os resultados foram testados pelo teste qui-quadrado com o *software* SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Em trios de casos-pais, o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) foi conduzido com o pacote

de *software* Statistical Analysis for Genetic Epidemiology (SAGE). O TDT é um teste baseado em família que oferece uma maneira poderosa de testar a transmissão de alelos-alvo de pais heterozigotos para os filhos afetados. A *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) também foram calculadas e $\text{OR} > 1$ significou um risco aumentado de FLNS/P. Todos os dados foram testados por valor de *p* bilateral e valores de $p < 0,05$ foram aceitos como significativos.

Resultados

A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg revelou que todos os indivíduos apresentavam equilíbrio genético em rs7078160 ([tabela 1](#)). A distribuição dos genótipos e alelos da variante rs7078160 em ambos os grupos de casos e controles é apresentada na [tabela 1](#). As proporções dos genótipos foram 21% AA, 57% AG, 22% GG nos casos e 11,7% AA, 51,7% AG, 36,7% GG em controles. A frequência do alelo G foi de 50,5% nos casos e 62,5% nos controles. As frequências alélicas de rs7078160 no grupo total de casos ($p=0,04$) e subgrupo FLPNS ($p=0,01$) foram substancialmente diferentes quando comparadas com o grupo controle; entretanto, as frequências alélicas nos subgrupos FLNS ($p=0,19$) e FPNS ($p=0,43$) não foram significantes quando comparadas ao grupo controle ([tabela 1](#)).

O OR e IC 95% entre AG+AA e GG para rs7078160 também mostraram diferenças significantes no grupo de casos totais ($p=0,04$, $\text{OR}=2,05$, IC 95%: 1,01–4,16) e o subgrupo FLPNS ($p=0,01$, $\text{OR}=3,94$; IC 95%: 1,34–11,54), enquanto os resultados não foram significantes nos subgrupos FLNS ($p=0,24$) e FPNS ($p=0,68$) ([tabela 2](#)). O teste de desequilíbrio de transmissão foi feito para trios com estrutura genética em heterozigose e nenhum desequilíbrio transmitido estatisticamente significativo foi detectado em rs7078160 ($p=0,68$) ([tabela 3](#)).

Discussão

O importante papel etiológico de rs7078160 foi relatado pela primeira vez por Mangold et al. em um estudo de associação ampla do genoma em populações europeias com FLNS/P.¹¹ O nucleotídeo de polimorfismo único (SNP) mais suscetível à FLNS/P em 10q25 foi rs7078160 no gene *Vax1* (Ventral Anterior Homeobox 1). O *Vax1* mostrou ser um gene crucial para o desenvolvimento do prosencéfalo basal e sistema visual em experimentos com animais e também participa da formação rostral de vertebrados.¹⁷

Tabela 1 Distribuições genotípicas e alélicas do rs7078160 em pacientes com FLNS/P e controles (^a $p < 0,05$)

Genótipo	Total	FLPNS	FLNS	FPNS	Controles
b					
Qui-quadrado	1,96	3,41	0,47	0,02	0,63
p-valor	0,16	0,06	0,49	0,90	0,43
Distribuição de genótipos					
AA (n, %)	21 (21)	9 (23,1)	7 (19,4)	5 (20,0)	7 (11,7)
AG (n, %)	57 (57)	25 (64,1)	20 (55,6)	12 (48,0)	31 (51,7)
GG (n, %)	22 (22)	5 (12,8)	9 (25,0)	8 (32,0)	22 (36,7)
Qui-quadrado	4,99	7,48	1,95	1,02	
p-valor	0,08	0,02 ^a	0,38	0,60	
Frequência alélica					
A (n, %)	99 (49,5)	43 (54,4)	34 (47,2)	22 (44,0)	45 (37,5)
G (n, %)	101 (50,5)	35 (44,3)	38 (52,8)	28 (56,0)	75 (62,5)
Qui-quadrado	4,36	5,95	1,76	0,62	
p-valor	0,04 ^a	0,01 ^a	0,19	0,43	

FLNS/P, fenda labial e palatina não síndrômica; FLPNS, Fenda labial e palatina não síndrômica; FLNS, Fenda labial não síndrômica; FPNS, Fenda palatina não síndrômica; EWH, Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 2 Resultados dos testes de associação com rs7078160 na fenda labial não síndrômica com ou sem fenda palatina (FLNS/P) (^a $p < 0,05$)

Variável	AG + AA	GG	Qui-quadrado	p-valor	Odds ratio	IC95%
Controles	38	22				
Total	78	22	4,05	0,04 ^a	2,05	1,01 – 4,16
Fenda labial e palatina não síndrômica (FLPNS)	34	5	6,78	0,01 ^a	3,94	1,34 – 11,54
Fenda labial não síndrômica (FLNS)	27	9	1,40	0,24	1,74	0,69 – 4,35
Fenda palatina não síndrômica (FPNS)	17	8	0,17	0,68	1,23	0,46 – 3,31

Slavotinek et al. relataram que a mutação em *Vax1* está associada à fenda labial e palatina humana, ausência da glândula pineal, agenesia do corpo caloso, malformações no hipocampo e pequenos nervos ópticos.¹⁸

Até o momento, vários estudos confirmaram a associação entre rs7078160 e FLNS/P em diferentes populações étnicas, inclusive japoneses, poloneses, africanos da África Central e populações do Sudeste da Ásia.¹²⁻¹⁴ Entretanto, resultados inconsistentes foram encontrados em chineses, quenianos e outros casos poloneses.^{15,19,20} Nos chineses, a pesquisa de Li et al. não identificou o risco de *Vax1* em FLNS/P na população do norte da China.¹⁵ No entanto, recentemente um estudo conduzido por Zhang et al. descobriu que o gene *Vax1* era um fator de risco para FLNS/P na população chinesa ocidental de etnia Han.⁵ Além da diferença geográfica, os diferentes métodos dos estudos podem ser uma explicação. Os primeiros estudos usaram o desenho de caso-controle, enquanto Zhang et al. adotaram o desenho de trio caso-pais.⁵ Neste estudo, escolhemos a população de etnia Han do sul da China como amostra. As frequências alélicas de rs7078160 no grupo FLPNS foram substancialmente diferentes quando comparadas ao grupo controle ($p = 0,02$, respectivamente) (tabela 1). O OR e IC de 95% entre AG + AA e GG mostraram diferença significativa no grupo de casos totais ($p = 0,04$, OR = 2,05, IC de 95%: 1,01-4,16) e subgrupo FLPNS ($p = 0,01$, OR = 3,94, 95% IC: 1,34-11,54), sugeriu que o alelo A de rs7078160 pode ser um fator de risco para FLNS/P, mas não está associado a FLNS e FPNS (tabela 2).

Tabela 3 Resultados do teste de desequilíbrio de transmissão

rs7078160	Transmitido	Não transmitido	Total
	A	G	
A	27	50	77
G	45	22	67
Total	72	72	144
Qui-quadrado	0,26		
p-valor	0,68		

O teste TDT não detectou desequilíbrio transmitido significativo em rs7078160 ($p = 0,68$) (tabela 3). Esse resultado foi conflitante com os estudos anteriores de FLNS/P de Li et al., já que eles não encontraram associação de *Vax1* e FLNS/P na população de etnia Han do norte da China.¹⁵ A inconsistência pode ser devido à diferença geográfica e ao desenho de amostragem diferente; o trio pais-caso completo pode fornecer informações genéticas mais abrangentes em comparação com o desenho de caso-controle.

De maneira coletiva, este estudo demonstrou que o polimorfismo rs7078160 está envolvido no desenvolvimento de FLNS/P em indivíduos da etnia Han do sul da China. Nosso estudo forneceu outra evidência para a etiologia de *Vax1* em FLNS/P da população chinesa de etnia Han. Entretanto, nosso estudo ainda tem várias limitações potenciais. Primeiro, nos concentramos em apenas um SNP, o rs7078160;

o estudo de mais SNPs candidatos poderia aumentar a significância de nosso estudo. Em segundo lugar, devido às dificuldades de coletar as amostras do trio completo, o número de casos e trios de controle era relativamente limitado. O aumento do número de indivíduos fortaleceria nossos resultados. Em terceiro lugar, as interações ambientais e os fatores maternos durante a gravidez não foram avaliados em nosso estudo. Mais esforços ainda são necessários para esclarecer a associação mais profunda entre hereditariedade e meio ambiente.

Conclusão

Este estudo revelou que o polimorfismo rs7078160 está envolvido no desenvolvimento de FLNS/P na população de etnia Han do sul da China, demonstra que *Vax1* pode estar associado a FLNS/P. Esses achados podem ser úteis para ampliar nosso conhecimento sobre a etiologia da FLNS/P.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

A todos os indivíduos que tornaram este estudo possível, especialmente aos pacientes, seus pais e aos controles que colaboraram voluntariamente. Esta pesquisa recebeu apoio do *Top Science and Technology Talent Project in Higher Education Institution of Guizhou Province* (Qian-Jiao-He KY Zi [2016]080), *Outstanding Young Talent Project of Zunyi Medical University* (17zy-002) e *Science and Technology Project of Zunyi Science and Technology Bureau* (ZSKHZC NS 2019-15).

Referências

- Rahimov F, Jugessur A, Murray JC. Genetics of Nonsyndromic Orofacial Clefts. *Cleft Palate-Craniofac J*. 2012;49:73–91.
- Chang WJ, See LC, Lo LJ. Time trend of incidence rates of cleft lip/palate in Taiwan from 1994 to 2013. *Biomed J*. 2016;39:150–4.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011;12:167–78.
- Fitzsimons KJ, Copley LP, Deacon SA, van der Meulen JH. Hospital care of children with a cleft in England. *Arch Dis Child*. 2013;98:970–4.
- Zhang BH, Shi JY, Lin YS, Shi B, Jia ZL. VAX1 gene associated non-syndromic cleft lip with or without palate in Western Han Chinese. *Arch Oral Biol*. 2018;95:40–3.
- Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet*. 2010;42:525–9.
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, et al. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet*. 2009;41:473–7.
- Grant SFA, Wang K, Zhang H, Glaberson W, Annaiah K, Kim CE, et al. A Genome-Wide Association Study Identifies a Locus for Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate on 8q24. *J Pediatr*. 2009;155:909–13.
- Ludwig KU, Mangold E, Herms S, Nowak S, Reutter H, Paul A, et al. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nat Genet*. 2012;44:968–71.
- Sun YM, Huang YQ, Yin AH, Pan YH, Wang YR, Wang C, et al. Genome-wide association study identifies a new susceptibility locus for cleft lip with or without a cleft palate. *Nat Commun*. 2015;6:6414.
- Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet*. 2010;42:24–6.
- Butali A, Suzuki S, Cooper ME, Mansilla AM, Cuenca K, Leslie EJ, et al. Replication of genome wide association identified candidate genes confirm the role of common and rare variants in PAX7 and VAX1 in the etiology of nonsyndromic CL(P). *Am J Med Genet A*. 2013;161:965–72.
- Figueiredo JC, Stephanie LY, Raimondi H, Magee K, Baurley JW, Sanchez-Lara PA, et al. Genetic risk factors for orofacial clefts in Central Africans and Southeast Asians. *Am J Med Genet A*. 2014;164A:2572–80.
- Mostowska A, Hozyasz KK, Wojcicka K, Biedziak B, Jagodzinski PP. Polymorphic variants at 10q25.3 and 17q22 loci and the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the polish population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012;94:42–6.
- Li DM, Liu TT, Meng XB, Guo Q, Shi JN, Hao YR, et al. Polymorphic variants in VAX1 and the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a population from northern China. *Medicine*. 2017;96:e6550.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Nnyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35:1547–9.
- Hallonet M, Hollemann T, Wehr R, Jenkins NA, Gruss P. Vax1 is a novel homeobox-containing gene expressed in the developing anterior ventral forebrain. *Development*. 1998;125:2599–610.
- Slavotinek AM, Chao R, Vacik T, Yahyavi M, Abouzeid H, Bardakjian T, et al. VAX1 mutation associated with microphthalmia, corpus callosum agenesis, and orofacial clefting: The first description of a VAX1 phenotype in humans. *Hum mutat*. 2012;33:364–8.
- Weatherley-White RC, Ben S, Jin Y, Riccardi S, Spritz RA. Analysis of genomewide association signals for nonsyndromic cleft lip/palate in a Kenya African cohort. *Am J Med Genet A*. 2011;155A:2422–5.
- Zawiślak A, Woźniak K, Jakubowska A, Lubiński J, Znamirska-Bajowska A. Polymorphic variants in *vax1* gene (rs7078160) and *bmp4* gene (rs762642) and the risk of non-syndromic orofacial clefts in the polish population. *Med Wieku Rozwoj*. 2014;18:16–22.