



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

Asociación entre variantes genéticas de los genes *MTHFS* y *SHMT1* y el riesgo de fisura labiopalatina no sindrómica en Chile.

Daniela Cifuentes Munzenmayer

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

José Suazo Sanhueza

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1170805
Santiago - Chile
2020**

Agradecimientos:

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor Dr. José Suazo Sanhueza, quien me guió a través de este camino y me apoyo enormemente para lograr mis objetivos en esta investigación además de brindarme las herramientas necesarias para realizar el proceso de investigación y escritura del manuscrito.

Quiero agradecerle a él por cada detalle y momento dedicado para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera durante este proceso, por su paciencia y voluntad.

También quiero agradecer a los revisores la Dra. Claudia Lefimil y el Dr. Victor Tirreau que se dieron el tiempo de leer mi tesis y realizar una retroalimentación para mejorar mi trabajo de investigación.

Por último, quiero agradecer a todos mis compañeros, mis amigos y a mi familia, por apoyarme aun cuando mis ánimos decaían. En especial, quiero mencionar a mi madre, mi hermano y mi novio, que siempre estuvieron ahí para darme palabras de apoyo y un abrazo reconfortante para renovar energías. Y a mi padre que desde el cielo me apoya y me ayuda a superar cada etapa.

Muchas gracias a todos.

INDICE

RESUMEN:	5
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	7
Fisuras orofaciales (FOFs)	7
Epidemiología	7
Desarrollo embrionario	8
Etiología	9
Factores de riesgo genéticos en la FL/PNS.	10
Factores de riesgo ambientales	10
Metabolismo de Folatos	11
Ciclo fútil del folato	12
Metilentetrahidrofolato sintetasa (<i>MTHFS</i>)	13
Serina hidroximetiltransferasa citosólica (<i>SHMT1</i>)	13
HIPÓTESIS.	15
OBJETIVO GENERAL.	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	15
METODOLOGÍA.	16
Sujetos	16
Obtención de los genotipos de los polimorfismos	17
Análisis Estadístico	17
RESULTADOS	18
DISCUSION	21
Asociación de <i>MTHFS</i> con la FL/PNS	22
Interacción de variantes de los genes <i>MTHFS</i> y <i>SHMT1</i> en FL/PNS en la población chilena.	25
CONCLUSIONES	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	29
Anexos.	36
Anexo 1: Acta de Aprobación Comité Etico Cientifico de Proyecto "NONSYNDROMIC OROFACIAL CLEFTS IN CHILE: THE ROLE OF PARENTAL BIOMARES OF FOLATE/ONE-CARBON METABOLISM".	36
Anexo 2: Consentimiento Informado.	36
Anexo 3: Aprobación del Comité de Bioseguridad.	43

RESUMEN:

Las fisuras orofaciales no sindrómicas (FOFNS) son el defecto del desarrollo craneofacial más común a nivel mundial y en Chile. Se producen debido a una alteración en la fusión de los tejidos que dan origen al labio superior y el paladar durante el desarrollo embrionario, afectando la estructura y conformación normal de la línea media facial.

Estas malformaciones se describen como multifactoriales, donde participan factores genéticos y ambientales, dentro de los cuales podemos mencionar el bajo consumo de folatos como uno de los más relevantes. En distintos países se han impulsado políticas públicas para aumentar el consumo de folatos en embarazadas, las cuales han dado resultados favorecedores, sin embargo en Chile, a pesar del aumento del consumo de estos nutrientes en la población de madres embarazadas, no ha disminuido significativamente la tasa de FOFs.

Por otra parte, en pacientes con FOFs se han descritos variables genéticas implicadas en el metabolismo del folato, que podrían estar involucradas en el desarrollo de este defecto de nacimiento, y que podrían estar relacionadas con estos resultados poco satisfactorio en la población chilena.

En este estudio, utilizando el diseño de tríos casos-progenitores con muestras de pacientes de la región metropolitana con fisura labiopalatina no sindrómica (FL/PNS), se evaluó la asociación del polimorfismo rs8032039 del gen *MTHFS* implicado en el metabolismo del folato con esta patología y su interacción con el polimorfismo rs1979277 del gen *SHMT1* el cual ha mostrado ser un factor protector para la expresión del fenotipo en esta misma población.

Los resultados de este estudio muestran que el polimorfismo rs8032039 del gen *MTHFS* se asocia al riesgo de FL/PNS en la población chilena, pero solo en varones. Por otra parte, al evaluar la interacción con el polimorfismo rs1979277 del gen *SHMT1* no se observó interacción entre estos dos genes, por lo tanto, el desarrollo de esta patología no estaría afectado por la interacción de estas variables polimórficas.

Los resultados entregados en este estudio nos ayudan a comprender parte de la etiología de esta malformación, la influencia del sexo de los individuos y orientar investigaciones futuras sobre el rol de variantes en otros genes involucrados en el metabolismo de folatos en estos defectos de nacimiento.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Fisuras orofaciales (FOFs)

Las fisuras orofaciales o fisuras labio palatinas, son malformaciones cráneofaciales congénitas, que se producen debido a una alteración en la fusión de los tejidos que dan origen al labio superior y el paladar durante el desarrollo embrionario. Afectan la estructura y conformación normal de la línea media facial, e incluyen la fisura labial aislada, la fisura palatina aislada y la fisura labiopalatina, que en todos los casos puede ser uni o bilateral (MINSAL, 2015).

Las personas con FOFs pueden padecer problemas con la deglución, la alimentación, el habla, la audición y la integración social, por lo que se requiere un manejo multidisciplinario, que incluye ginecólogos ecografistas enfermeras, cirujanos plásticos e infantiles, maxilofaciales, otorrinolaringólogos, fonoaudiólogos, genetistas, psicólogos, odontopediatras, ortodoncistas, kinesiólogos, entre otros (Dixon et al., 2011).

Epidemiología

Las FOFs son una de las malformaciones más comunes a nivel mundial y se presentan en promedio en 1 de cada 700 recién nacidos vivos (RNV)(Brito et al., 2012). Esta prevalencia presenta una amplia variabilidad según el origen geográfico, los grupos raciales y étnicos, así como las exposiciones ambientales y el estado socioeconómico de las poblaciones analizadas. Las poblaciones asiáticas y amerindias tienen las tasas de prevalencia de nacimientos más altas, aproximadamente 1/500 RNV, las poblaciones de origen europeo tienen tasas de prevalencia intermedias de 1/1000 RNV, y las poblaciones derivadas de África tienen las tasas de prevalencia más bajas de aproximadamente 1/2500 RNV (Mossey & Little, 2009). En Chile la incidencia es de 1 cada 650 nacidos vivos, lo que convierte a este defecto de nacimiento en un problema de salud pública (Rivera & Arenas, 2013).

La frecuencia de las fisuras también difiere según el sexo y la lateralidad: en hombres es más común encontrar fisuras que involucran el labio y paladar, y en el caso del sexo femenino es mayor la proporción de fisuras palatinas aisladas. En relación a la lateralidad hay una proporción 2:1 de fisuras del lado izquierdo versus el derecho entre los casos de fisura labial unilateral (Shkoukani et al., 2013).

Desarrollo embrionario

El desarrollo de las estructuras faciales comienza en la 4^a semana de gestación cuando las células de la cresta neural migran para formar los cinco primordios faciales: la prominencia frontonasal (PFN), los procesos mandibulares (PM), y los procesos maxilares (PMX). Las prominencias faciales reciben un importante aporte de las células de la cresta neural, derivadas del ectodermo en los márgenes de los pliegues neurales bilateralmente y el área de transición entre el neuroectodermo y la epidermis; estas se ubican de manera segmentaria a lo largo del tubo neural (Burg et al., 2016). Las células de la cresta neural migran hacia los complejos cráneo-faciales y faríngeos debido a eventos inductivos entre el cerebro anterior, medio y posterior, cuya sincronización está determinada por un patrón de señalización de los genes *Hox*, *Ssh*, *Otx*, *Gsc*, *Dlx*, *Msx*, *Lhx* y *Prrx* (Chai & Maxson, 2006). Las alteraciones en la migración o proliferación de las células de la cresta neural van a producir diversas malformaciones cráneo-faciales dentro de las cuales podemos encontrar las FOFs (Hall, 1999)(Eppley et al., 2005).

Después de que se forman las prominencias faciales, las placodas nasales se invaginan para formar los procesos nasales mediales (PNM) y laterales (PNL). Durante la 6^a y 7^a semanas de gestación, ocurre la combinación de los procesos nasales laterales con el proceso maxilar y luego se fusionan con el proceso medial, formando el labio superior y el paladar primario (Jiang et al., 2006). Para esta fusión se requiere un crecimiento coordinado entre las prominencias y la apoptosis del epitelio que forma el puente nasal transitorio (Mangold et al., 2011). La falla en el crecimiento o la fusión de estos procesos da como resultado fisuras

orofaciales que involucran el labio superior, los alvéolos y/o el paladar primario (Jiang et al., 2006).

El paladar secundario comienza a desarrollarse en la 7ª semana de embriogénesis, cuando los procesos palatinos emergen a partir de los procesos maxilares. El proceso palatino inicialmente crece verticalmente a lo largo de los lados de la lengua, pero luego se eleva a una posición horizontal a medida que la lengua desciende (Gritli-Linde, 2007). El crecimiento continuo conduce a la unión del proceso palatino en la línea media seguida de fusión a lo largo del epitelio del borde medial (MEE). La fusión del paladar secundario ocurre desde anterior a posterior, comenzando en el foramen incisivo y concluyendo con la fusión de la úvula. La fusión exitosa del paladar secundario da como resultado una separación completa de las cavidades nasal y oral.

Las fisuras del paladar pueden surgir debido a fallas en cualquiera de los pasos, incluida la elevación, migración o fusión de los procesos (Gritli-Linde, 2007), lo que puede deberse a factores genéticos, mecánicos o teratogénicos que alteran los procesos de crecimiento, rotación y fusión (Afshar & Helms, 2012).

La fisura del paladar primario ocurre con mayor frecuencia entre el paladar primario y el secundario, a la altura del foramen incisivo, el cual separa los incisivos laterales y los caninos. Las posibles causas de las fisuras que han sido identificadas hasta el momento son: la deficiencia de mesénquima, una osificación tardía, la disminución del volumen de la premaxila, el aumento de la apoptosis o el aumento de la reabsorción ósea (Burg et al., 2016).

Etiología

Las fisuras orofaciales aisladas sin otras malformaciones ni síndromes asociados (FOFNS) se describen como multifactoriales, donde participan factores genéticos, ya que hay un antecedente familiar en un 20 a 30% de los casos, y factores ambientales, tales como fármacos, nicotina, alcohol, enfermedades crónicas de la madre, déficit de folatos, estrés, entre otros, todos críticos durante el primer trimestre de la gestación (MINSAL, 2015).

Factores de riesgo genéticos en la FL/PNS.

Se ha demostrado que las fisuras labio palatinas tienen un componente genético basado en su alta tasa de recurrencia en familias de individuos afectados. Los estudios de gemelos también han demostrado que los gemelos monocigóticos presentan tasas de concordancia mayores que los gemelos dicigóticos (Burg et al., 2016).

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 ($TGF\beta$), que incluye las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) y las activinas (Carinci et al., 2007). Alteraciones en esas familias y sus vías de señalización pueden dar origen a defectos disruptivos orofaciales de diversa complejidad (Rivera & Arenas, 2013).

Sumando a esto, debemos tener en cuenta que el desarrollo de la línea media facial está regulado por la expresión de múltiples genes y vías de señalización que han sido implicados con la expresión de las FLP/NS, en humanos, tales como *TGFA*, *FGF8* y *FGFR1*, *TGFB3*, *BMP7*, *MSX1*, *IRF6*, los que presentan tanto variantes asociadas al fenotipo o mutaciones potencialmente causales (Rivera & Arenas, 2013).

Factores de riesgo ambientales

Múltiples factores de riesgos ambientales se han identificado en el desarrollo de las FOFNS. Los principales incluyen la exposición materna al humo del tabaco, el alcohol, los corticosteroides, anti convulsionantes y estrés fisiológico materno (Rivera & Arenas, 2013), ciertas deficiencias nutricionales debido a la baja ingesta de cobalaminas y folatos, ambas vitaminas pertenecen al complejo B, las que se encuentran estrechamente relacionadas en el metabolismo de un carbono (Shaw et al., 2013).

Metabolismo de Folatos

El folato es una vitamina esencial del complejo B soluble en agua, que se encuentra particularmente en frutas y verduras, especialmente en legumbres y verduras de hoja verde oscuro (Li et al., 2016).

Los animales no pueden sintetizar estos folatos *de novo*, por lo que el consumo de plantas ricas en estas o de derivados sintéticos como el ácido fólico son el principal recurso de obtención de estas vitaminas en animales (Imbard et al., 2013). La importancia de la ingesta materna de ácido fólico/folatos se ha demostrado al observar que la suplementación periconcepcional con esta vitamina se asocia con una disminución en el riesgo de FOFs de 36% a 75% (Wilcox et al., 2007).

Las coenzimas de los folatos funcionan para aceptar y transferir unidades de un carbono (1-C) que intervienen en la síntesis, la interconversión y la modificación de nucleótidos, aminoácidos y otros componentes clave de la célula (Bowman & Russel, 2003), así como también en la metilación del DNA (Mentch et al., 2015). La metilación del DNA es una modificación epigenética capaz de regular la expresión génica sin cambiar la secuencia del material genético y son heredables tanto en la división celular como de padres a hijos. Alteraciones en este patrón de metilación se han asociado con las FOFNS (Sharp et al., 2018), lo que podría explicar la relación entre el metabolismo del folato y estos defectos del nacimiento.

Los factores que pueden afectar negativamente al metabolismo de 1-C dependiente de los folatos son: el consumo insuficiente del nutriente, su menor biodisponibilidad, los polimorfismos genéticos relacionados con el transporte y metabolismo de esta vitamina y las interacciones con diversos nutrientes y fármacos (Bowman & Russel, 2003). Estudios observacionales y meta-análisis han encontrado resultados consistentes entre la asociación de la metilación diferencial y el riesgo de fisura labio palatina, en bebés de madres expuestas al tabaco, déficit de folatos y obesidad (Sharp et al., 2018).

La deficiencia de folatos ha sido vinculada a cambios en la metilación del ADN de la sangre del cordón umbilical neonatal, a través de su papel como coenzima del metabolismo de un carbono, el folato está directamente involucrado en la transferencia del grupo metilo en el proceso de metilación del DNA. Lo que pone en evidencia que la deficiencia tanto de consumo de folato, y/o alteraciones de su metabolismo podrían resultar en posibles factores de riesgo para las fisuras labio palatina no sindrómicas.

Ciclo fútil del folato

Se ha descrito que el denominado "ciclo fútil del folato", permite mantener un metabolismo normal del carbono durante etapas de alta tasa proliferativa como el desarrollo embrionario y neoplasias (Girgis et al., 1997).

El ciclo fútil del folato incluye la conversión de 5-formiltetrahidrofolato (5-FTHF) en 5,10-meteniltetrahidrofolato (5,10-CHTHF) por 5,10-metaniltetrahidrofolato sintetasa (MTHFS) en presencia de ATP. 5,10-CHTHF se convierte a su vez en 5-FTHF por la serina hidroximetiltransferasa citoplasmática (SHMT1). En una reacción dependiente de NADPH, el 5,10-CHTHF se reduce a 5,10-metilenetetrahidrofolato (5,10-CH₂-THF), un sustrato posteriormente reducido a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) por MTHFR, este último folato es necesario para la remetilación de la homocisteína y la posterior síntesis de S-adenosín-metionina (SAM), identificado como el principal compuesto que dona grupos metilo para la metilación de ADN, histonas y otras proteínas. (M. Field et al., 2007).

Por lo tanto, el "ciclo fútil" catalizado por SHMT y MTHFS puede cumplir funciones reguladoras controlando las concentraciones de 5-FTHF (la forma más estable de folato reducido), y regulando así el flujo de las unidades de carbono. MTHFS ha sido sugerido como un objetivo para el desarrollo de agentes anti proliferativos porque afecta las concentraciones celulares de 5-FTHF que están reguladas por el ciclo inútil. 5-FTHF se sintetiza a partir de metenilTHF en una segunda reacción catalizada por SHMT1 (M. Field et al., 2007).

Es importante mencionar que está demostrado que el ciclo fútil de 5-FTHF es fundamental para mantener la estabilidad de la red del metabolismo del carbono mediado por folato (Misselbeck et al., 2019).

Metilentetrahidrofolato sintetasa (*MTHFS*)

La proteína codificada por este gen es una enzima que cataliza la conversión de 5-formiltetrahidrofolato a 5,10-meteniltetrahidrofolato, un precursor de folatos reducidos involucrados en el metabolismo del carbono. Un aumento de la actividad de la proteína codificada puede dar como resultado un aumento de la tasa de rotación de folato y el agotamiento del folato (Genetic Home Reference, (Reference, s. f.). (Misselbeck et al., 2019)

MTHFS ayuda a regular el flujo de carbono a través de la red metabólica de un carbono dependiente de folato que suministra carbono para la biosíntesis de purinas, timidina y aminoácidos.

Las interrupciones en esta red metabólica pueden resultar de polimorfismos de un solo nucleótido, o de baja concentración intracelular de folatos y/o de otros factores ambientales. Las aberraciones en el metabolismo del folato aumentan el riesgo de patologías tales como cánceres epiteliales, anomalías del desarrollo, como fisuras labiopalatinas y enfermedades cardiovasculares (M. Field et al., 2007; Salamanca et al., 2019).

Serina hidroximetiltransferasa citosólica (*SHMT1*)

Este gen codifica la forma citosólica de serina hidroximetiltransferasa, una enzima que contiene fosfato de piridoxal que cataliza la conversión reversible de serina y tetrahidrofolato a glicina y tetrahidrofolato de 5,10-metileno. Esta reacción proporciona unidades de un carbono para la síntesis de metionina, timidilato y purinas en el citoplasma, desempeñando un papel clave en la inducción de la metilación de genes y síntesis del DNA. El funcionamiento anormal de SHMT1 puede afectar a la progresión celular (Wang et al., 2015).

Una microdelección en la región del cromosoma que contiene *MTHFS* ha sido detectada en pacientes con fisuras labiopalatinas y otros defectos craneofaciales. Además, se ha asociado un SNP de este gen con el riesgo de FLP/NS en una población de ascendencia mexicana en Estados Unidos (Blanton et al., 2011). Solo un estudio ha asociado SNP de *SMHT1* y fisura palatina no sindrómica en una población noruega (Boyles et al., 2009).

Basado en los antecedentes descritos anteriormente en este trabajo de tesis, se estudió la asociación entre el polimorfismo del gen *MTHFS* (rs8032039) y el riesgo de fisuras labio palatinas no sindrómicas en la población chilena. Esta variante (del tipo SNP) es menos frecuente en un grupo de 96 casos chilenos con este mismo fenotipo, con relación a una muestra de 208 controles (Odds Ratio 0,53; $p=0,002$, datos no publicados). Además, se analizó la interacción de esta variante con el polimorfismo funcional rs1979277 (p.Leu474Phe) del gen *SHMT1*, que ya ha sido demostrado que tiene un efecto protector para la expresión del fenotipo en la población chilena (Salamanca et al., 2019). Este análisis se realizó usando el diseño de tríos caso-progenitores, que es insensible a la estratificación poblacional por origen étnico, que afecta los resultados de los estudios de asociación de casos y controles (Santos et al., 2002).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS.

El riesgo de fisura labiopalatina no sindrómica en pacientes chilenos está asociado a una variante polimórfica del gen *MTHFS*, que a su vez interactúa con un polimorfismo del gen *SHMT1*, ambos participantes del metabolismo del folato.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la asociación entre la variante polimórfica rs8032039 del gen *MTHFS* y el riesgo de fisura labiopalatina no sindrómica en la población chilena (FL/PNS) y su interacción con el polimorfismo rs1979277 del gen *SHMT1* en la expresión de este fenotipo usando el diseño de tríos caso-progenitores.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.- Identificar la asociación entre el polimorfismo del gen *MTHFS* (rs8032039) y el riesgo de fisuras labio palatinas no sindrómicas en la población chilena usando el diseño de tríos caso-progenitores.
- 2.- Analizar la interacción de las variables polimórficas rs8032039 de *MTHFS* y rs1979277 del gen *SHMT1* en el riesgo de fisuras labio palatinas no sindrómicas usando el diseño de tríos caso-progenitores.

METODOLOGÍA.

Sujetos

La muestra estuvo conformada por 119 tríos caso-progenitores no relacionados para un total 357 individuos (238 progenitores y 119 casos). Estos individuos fueron reclutados durante los años 2017 y 2018, entre pacientes con FOFNS en diferentes hospitales de la región Metropolitana: San Borja Arriarán, Roberto del Río, Exequiel González Cortés y la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Entre los casos, el 33% son del sexo femenino y un 31% tiene historia familiar previa de FOFs. A todos los participantes de esta investigación (o a su representante legal en el caso de los menores de edad) se les informó sobre este estudio, los que aceptaron participar voluntariamente y firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexos 1, 2 y 3). Para el grupo de casos, los criterios de inclusión para esta investigación fueron: pacientes chilenos de estos hospitales que tuvieran FL/P (fisura de labio con o sin fisura de paladar) uni o bilaterales, y que no estuviesen asociadas a un síndrome u otra malformación, en base al diagnóstico de un médico genetista. Los criterios de exclusión usados fueron pacientes cuyas madres hayan estado expuestas durante su embarazo o practicado alguno de los factores conocidos causantes de fisuras orofaciales (consumo de warfarinas, fentoina y alcohol), y que el paciente sea extranjero o tenga padres y/o abuelos extranjeros. A todos los participantes se les tomó una muestra de hisopado bucal, las que se enviaron al Biobanco de Tejidos de la Universidad de Chile (BTUCH), en donde se extrajo el DNA genómico usando el protocolo comercial (QIAamp DNA Blood Mini Kit; QIAGEN), y se almacenaron. Para la realización de esta tesis se solicitó la cantidad necesaria DNA a este centro para la técnica de genotipificación.

Obtención de los genotipos de los polimorfismos

La variante rs8032039 del gen *MTHFS* fue genotipificada con ensayos de discriminación alélica usando sondas Taqman (Applied Biosystems, código del ensayo C__3075961_10) en una plataforma de PCR en tiempo real (StepOne, Applied Biosystems), en base a las indicaciones del fabricante. En el caso de la variante rs1979277 (*SHMT1*) los genotipos fueron extraídos de los datos de una publicación previa de este mismo grupo de investigación (Salamanca et al. 2020), usando la misma tecnología de sondas TaqMan PCR en tiempo real (código del ensayo C__3063127_10).

Análisis Estadístico

Las frecuencias alélicas para estos polimorfismos fueron estimadas utilizando tanto los genotipos parentales como de los casos usando proporciones simples. Para evaluar el patrón diferencial de la transmisión de los alelos de progenitores a progenie afectada en la muestra de tríos-casos progenitores se empleó el test de desequilibrio de transmisión (TDT, (Spielman et al., 1993), implementado en el paquete STATA 15.0. La interacción entre las variantes fue evaluada mediante un modelo de interacción en escala aditiva (Dayal, 1980) en las que se evaluó las diferencias de distribución de las combinatorias de alelos de ambas variantes entre casos y pseudocontroles (construidos con los alelos no transmitidos de progenitores a progenie). Alternativamente, se utilizó un modelo de interacción en escala multiplicativa en base a regresión logística (Zhao et al., 2006), implementada en el paquete STATA 15.0

RESULTADOS

En la Tabla 1 se encuentra las frecuencias alélicas y genotípicas de la variante rs8032039 del gen *MTHFS* en la muestra de 119 tríos-caso progenitores con FL/PNS de la población chilena. En esta tabla se aprecian las frecuencias de los progenitores separadas de la de los casos. Si bien estas diferencias no son significativas, se observa tanto que la frecuencia del alelo menor (A) como del genotipo AA es menor en casos que en progenitores ($p = 0,264$ y $p = 0,436$, respectivamente).

Tabla 1

Frecuencia del SNP rs8032039 del gen *MTHFS* en una muestra de 119 tríos-caso progenitores con FL/PNS de la población chilena.

Alelos	Progenitores (N = 238)	Casos (N = 119)
A	103 (0,216)	43 (0,180)
G	373 (0,783)	195 (0,819)
Genotipos		
AA	9 (0,037)	2 (0,016)
AG	85 (0,357)	39 (0,327)
GG	144 (0,605)	78 (0,655)

Respecto a los resultados del test de desequilibrio de la transmisión (TDT) en base al alelo de menor frecuencia (A), se observa que en el total de tríos no existe una transmisión preferencial (Tabla 2). Así, el alelo A se transmitió 52 veces y no se transmitió 35 veces de progenitores a progenie ($p = 0,684$). Al separar por el sexo de los casos, se observa que en varones el alelo A se transmitió preferentemente de progenitores a progenie (40 veces transmitido versus 23 veces no transmitido), con un p-value de 0,032 (Tabla 2). Por su parte, en los casos de sexo femenino, el alelo A se transmitió 12 veces, mismo número de oportunidades en que no se transmitió ($p = 1,000$; Tabla 2).

Tabla 2

Test de desequilibrio de transmisión (TDT) para el alelo A del SNP rs8032039 del gen *MTHFS* en una muestra de 119 tríos-caso progenitores con FLPNS de la población chilena.

	Transmitido	No transmitido	p-value
Varones	40	23	0,032
Mujeres	12	12	1,000
Total	52	35	0,684

El segundo objetivo de esta tesis tiene relación con la interacción entre variantes de los genes *MTHFS* y *SHMT1* en el riesgo de FLPNS. Para ello, se propuso analizar la relación entre los genotipos para dos SNPs en la muestra de tríos: rs8032039 del gen *MTHFS* (analizado en esta tesis) y rs1979277 del gen *SHMT1* (previamente publicado para esta misma muestra por Salamanca et al., 2020). La propuesta original consideraba la utilización de la fórmula de interacción de escala aditiva (Dayal, 1980). Al analizar la distribución de genotipos de ambos SNPs para casos y pseudo-controles, algunas combinatorias mostraron un cero como resultado. Dado que la fórmula de Dayal (1980) está basada en *odds ratios* no pudo aplicarse. Por ello se optó en forma alternativa por analizar la interacción gen-gen en escala multiplicativa (Zhao et al., 2006). Como resultado de este análisis no se observa evidencia de interacción entre los genotipos de estas variantes en el riesgo de FL/PNS tanto para la muestra total ($p = 0,598$), como en la estratificación por sexo: $p = 0,994$ para varones y $p = 0,125$ para mujeres (Tabla 3).

Tabla 3

Análisis de interacción gen-gen en escala multiplicativa para los SNPs rs8032039 (*MTHFS*) y rs1979277 (*SHMT1*) en una muestra de 119 tríos-caso progenitores con FL/PNS de la población chilena.

	p-value
Muestra total	0,598
Hombres	0,994
Mujeres	0,125

DISCUSION

La importancia de la ingesta materna de ácido fólico/folatos en la expresión FOFs se ha demostrado al observar que la suplementación periconcepcional con esta vitamina se asocia con una disminución en su riesgo en diversos reportes. Un estudio realizado en la población noruega ha demostrado que su uso disminuye el riesgo de FOFs en aproximadamente un tercio (Wilcox et al., 2007). Sumado a esto, estudios realizados en otros países como Estados Unidos y Brasil, también han obtenido resultados que demuestran una disminución de la incidencia de FL/PNS asociado a la fortificación con ácido fólico en la harina de trigo (Paulos et al., 2016). Desde enero del año 2000, en Chile se estableció la fortificación obligatoria de la harina de trigo con ácido fólico que tuvo como consecuencia una disminución aproximadamente de un 50% de las malformaciones relacionadas a los defectos del cierre del tubo neural; sin embargo, no logró cambios significativos en la prevalencia de FL/PNS (Nazer y Cifuentes, 2014). Por lo tanto, podríamos considerar que la disponibilidad de ácido fólico en Chile no sería el principal responsable de FL/PNS y su causa estaría relacionada al metabolismo de este. Existe evidencia científica que demuestra que la presencia de polimorfismos en genes que codifican proteínas y enzimas del transporte y metabolismo del folato, pueden afectar los indicadores bioquímicos del estado nutricional de esta vitamina en humanos (Herrera et al., 2016).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la asociación entre la variante polimórfica rs8032039 del gen *MTHFS* y el riesgo de fisura labiopalatina no sindrómica en la población chilena (FLPNS) y su interacción con el polimorfismo rs1979277 del gen *SHMT1*, ambos participantes del metabolismo del folato.

Se utilizó el diseño de tríos caso-progenitores ya que evita los problemas de resultados falsos positivos debidos a estratificación poblacional, básicamente porque el caso observado es siempre comparado con un «pseudocontrol» (construido con los alelos no transmitidos de progenitores a prole afectada) pareado étnicamente con los casos (Beatty et al., 2002).

Asociación de *MTHFS* con la FL/PNS

Como resultado de nuestro primer objetivo, no se observó una transmisión preferencial del alelo de riesgo en la muestra total (Tabla 2). Este resultado se puede relacionar a lo observado en la tabla 1 que el alelo menor (A) es más frecuente en los progenitores que en la progenie afectada. Por lo tanto, en esta muestra de la población chilena, el polimorfismo rs8032039 del gen *MTHFS* no cambia el riesgo de expresar FL/PNS.

Al separar la muestra de casos por sexo, se observa que en varones el alelo A se transmitió preferentemente de progenitores a progenie (Tabla 2). Por su parte, en los casos de sexo femenino, el alelo A se transmitió el mismo número de oportunidades en que no se transmitió (Tabla 2) por lo tanto se observa una transmisión preferencial en varones respecto a las mujeres. El sexo es una covariable con un efecto importante sobre la asociación entre marcadores genéticos y FL/PNS. Se ha descrito en otras investigaciones en la población chilena que la asociación genética entre este fenotipo y variantes para los genes *BMP4* e *IRF6* difiere cuando los sujetos se estratifican por sexo (Suazo et al., 2011).

En los seres humanos, el dimorfismo sexual se puede observar en la prevalencia, el curso y la gravedad de muchas enfermedades comunes. Estudios recientes sugieren que la arquitectura genética específica del sexo también influye en los fenotipos humanos, incluidos los rasgos reproductivos, fisiológicos y patológicos. Es probable que un mecanismo subyacente sea la regulación diferencial de genes en hombres y mujeres, particularmente en genes sensibles a los esteroides sexuales (Ober et al., 2008). Utilizando modelos animales, se ha informado de la expresión génica con sesgo sexual para los tejidos gonadales y extragonadales durante la embriogénesis, donde los principales determinantes de estas diferencias son las hormonas sexuales (Ellegren & Parsch, 2007) (Bardin & Catterall, 1981).

El rostro humano adulto muestra un dimorfismo sexual que parece establecerse en los primeros años de vida pero que podría depender de factores expresados en la vida prenatal (Bulygina et al., 2006). Estas evidencias y nuestros hallazgos en el presente estudio están estrechamente relacionados con hallazgos epidemiológicos que muestran una mayor frecuencia de FL/PNS en hombres que en mujeres.

En nuestro conocimiento no hay estudios previos que relacionen al polimorfismo rs8032039 del gen *MTHFS* con su participación en el desarrollo de esta malformación como con ninguna otra patología. En un intento de darle un sentido biológico a nuestros resultados, analizamos la evidencia depositada en la página del proyecto GTEx (<https://gtexportal.org/home/>) que muestra que esta variante está asociada con cambios significativos en la expresión del gen, en donde los individuos con genotipo AA tiene niveles mayores del mRNA en tejidos como musculo esquelético, piel, musculo cardiaco y arterias. Por otra parte, de acuerdo a la base de datos *Ensembl* (<https://www.ensembl.org/index.html>), esta variante se encuentra en el último intrón del gen, lejos de posiciones que pudieran tener efecto sobre el procesamiento del transcrito primario de RNA. En este sentido, se observó que este polimorfismo no se encuentra en desequilibrio de ligamiento con ninguna variante funcional según lo depositado en la base de datos HaploReg (<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>), es decir no se hereda en la población junto a una variante conocida con efecto sobre la función del gen en las poblaciones incluidas en esta base. En síntesis, si esta variante pareciera no tener un efecto directo sobre la función del gen *MTHFS*, podría estar demostrando la presencia de un cambio desconocido en su vecindad que si tuviese una relación de causalidad con el fenotipo.

Se ha descrito que variantes polimórficas del gen *MTHFS* podrían estar asociadas a distintas enfermedades crónicas. Entre estas podemos mencionar enfermedad renal crónica y riesgo de enfermedad cardiovascular en población caucásica (Kottgen et al., 2008). Así también se ha relacionado con algunos tipos de canceres como de pulmón, linfoma o neuroblastoma (Field et al., 2006; Lee et al., 2007). Las neoplasias son estados asociados con mayores tasas de proliferación

celular y replicación del ADN que aumentan la demanda de cofactores de folato para la biosíntesis de timidilato y purina, por lo tanto se ha descrito que la expresión de *MTHFS* está elevada en los tejidos tumorales de animales en comparación con el tejido normal circundante (Field et al., 2009). También se ha encontrado que mutaciones de este gen pueden generar trastornos cerebrales por déficit de folato como el síndrome de deficiencia de folato cerebral (Sakthivel et al., 2020).

Si bien no existen reportes de la relación entre este gen y las fisuras orofaciales, según la base de datos *Bgee* (<https://bgee.org/>) *MTHFS* se expresa en los procesos frontonasales y maxilares en el desarrollo craneofacial de ratón. Los seres humanos con errores innatos del metabolismo de esta enzima exhiben acumulación de 5-FTHF en fibroblastos cultivados y niveles bajos de folato en el líquido cefalorraquídeo (LCR) con secuelas neurológicas acompañantes (Rodan et al., 2018), por lo tanto actualmente se cree que *MTHFS* es esencial en células de mamíferos para prevenir la acumulación de folato celular como 5-FTHF. (Misselbeck et al., 2019).

En un estudio hecho en fetos de conejos, se descubrió que la actividad de *MTHFS* es baja hasta la mitad de la gestación, después de lo cual su actividad aumenta para asegurar un suministro adecuado de 5,10-MTHF para satisfacer las demandas metabólicas de feto en crecimiento durante el período tardío y posnatal. La falta de actividad de *MTHFS* debido a trastornos adquiridos o hereditarios da como resultado una disminución de la biodisponibilidad de 5,10-MTHF, comprometiendo los procesos biológicos dependientes de 5-MTHF (Thompson et al., 2001).

Es importante mencionar que la enzima participa en la conversión de 5-formiltetrahidrofolato en 5,10-meteniltetrahidrofolato, un precursor de folatos reducidos implicados en el metabolismo de un carbono, un aumento de la actividad de la proteína codificada puede resultar en una mayor tasa de renovación de folato y reducción de folato (Misselbeck et al., 2019).

Las simulaciones de modelos de vías metabólicas indican que MTHFS juega un papel esencial en la prevención de la acumulación de 5-FTHF, que en consecuencia evita la inhibición de todas las demás reacciones en la red metabólica. Además, los experimentos *in silico* muestran que la inhibición de MTHFS por 10-FTHF es fundamental para regular la síntesis de purina (Misselbeck et al., 2019). La función de la enzima MTHFS además está interconectada con el metabolismo de la metionina al proporcionar los grupos metilo para la remetilación de homocisteína de nuevo a metionina (Chowdhury et al., 2012). Por lo tanto, resulta de interés seguir investigando una posible relación de este gen en las fisuras labio palatinas no sindrómicas.

Interacción de variantes de los genes *MTHFS* y *SHMT1* en FL/PNS en la población chilena.

Al evaluar la interacción de variantes polimórficas de los genes *MTHFS* y *SHMT1* no se observaron resultados significativos, tanto para la muestra total como por sexo (Tabla 3). Este resultado se puede explicar por una parte considerando que efectivamente no existe interacción entre estas variantes, lo que no implica que no la exista entre otras variantes de estos genes, dado que participan en el mismo ciclo del folato (ciclo futil), como antes se menciona.

Otra posible explicación es que el tamaño muestral utilizado no es el adecuado para detectar interacción gen-gen. En base a simulaciones matemáticas, se ha demostrado que los tamaños muestrales para detectar los mismos efectos de asociación en interacción gen-gen son varias veces mayores en relación a estudios de un solo gen (Mutsert et al., 2009). Por ello sería recomendable para investigaciones futuras aumentar el tamaño muestral para mejorar el poder estadístico y confirmar o descartar la interacción.

Es preciso mencionar que durante esta investigación se cambió el modelo de interacción planteado inicialmente, debido a que los datos obtenidos no se pudieron evaluar con la escala aditiva, por lo cual, se utilizó un modelo multiplicativo en vez de uno aditivo. Ambos tipos de escalas son útiles al momento de medir interacciones estadísticas, si bien en salud pública la escala aditiva es la usada preferentemente, la escala multiplicativa puede ser la que más naturalmente corresponda a mecanismos biológicos (VanderWeele & Knol, 2014).

Cabe destacar que la interpretación biológica de las interacciones estadísticas es compleja; el grado en el que la interacción estadística implica interacción o sinergismo en un sentido causal puede ser extremadamente limitado (Cordell, 2009). Además, debe tenerse en cuenta que un efecto de interacción observado puede no tener implicaciones sobre los mecanismos biológicos subyacentes o asimismo resultados no significativos no necesariamente implicarían la ausencia de interacción biológica (Mutsert et al., 2009).

Finalmente, no se debe olvidar que FL/PNS es una patología de etiología multifactorial, en la que intervienen factores ambientales y hereditarios, y entre los involucrados con el ácido fólico se conocen más de 50 genes con polimorfismos de riesgo que podrían contribuir a que se presente este defecto congénito, por lo que los polimorfismos estudiados en esta investigación son solo algunos de los que podrían contribuir a la expresión de esta enfermedad, siendo otras interacciones las que podrían dar como resultado las fisuras labio palatinas no sindrómicas. Por lo cual sería interesante continuar investigando con mayor profundidad el rol de los polimorfismos de los genes implicados en el metabolismo del folato.

Como debilidad de los resultados de este estudio, podemos mencionar que no se alcanza un correcto poder estadístico. Considerando la frecuencia del alelo menor de rs8032039 en nuestra muestra, su patrón de transmisión de progenitores a progenie y el tamaño muestral, solo se alcanzó un poder estadístico de 60%. Esto también impacta al poder estadístico del análisis de

interacción gen-gen. No obstante, debemos mencionar las fortalezas de este estudio entre las cuales destacamos, el diseño de estudio (trio cas-progenitores) que nos permite tener una aproximación más certera de los resultados ya que como se mencionó anteriormente evita los problemas de resultados falsos positivos debidos a estratificación poblacional. Además, como fortaleza también podemos destacar el tipo de análisis de interacción multiplicativo que se aplicó, el cual se condice de mejor forma con los fenómenos biológicos.

CONCLUSIONES

Podemos entonces concluir, sobre el primer objetivo de esta tesis, que el polimorfismo rs8032039 del gen *MTHFS* se asocia al riesgo de fisura labiopalatina no sindrómica en la población chilena, pero solo en varones. Este gen se expresa en estadios de mayor proliferación celular como lo son el desarrollo embrionario. Su deficiencia o funcionamiento errado podría provocar una función defectuosa en la red de carbono dependiente de folato por consecuencia en la biosíntesis de bases nitrogenadas y en la metilación del DNA que es un mecanismo esencial para controlar la expresión génica y obtener un desarrollo normal. Este resultado se puede asociar evidencias que indica que existe un mecanismo subyacente en la regulación diferencial de genes en hombres y mujeres, particularmente en genes sensibles a los esteroides sexuales, en el caso del desarrollo cráneo facial estas diferencias entre los distintos sexos podría depender de factores expresados en la vida prenatal, por lo cual podríamos inferir que estos genes estudiados podrían estar influenciados por hormonas sexuales y causar la mayor prevalencia en varones que en mujeres.

En conclusión, respecto al segundo objetivo de nuestra investigación podemos decir que no se observó interacción multiplicativa entre estos dos polimorfismos, rs8032039 del gen *MTHFS* y rs1979277 del gen *SHMT1*, por lo cual no estarían implicados en el desarrollo de la patología en su conjunto, sin embargo, se sugiere realizar investigaciones posteriores con un tamaño muestral más amplio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Afshar, M., & Helms, J. (2012). Embryology of the craniofacial complex, in *Plastic Surgery*, ed P. Elsevier, 503–516.
- Bardin, C. W., & Catterall, J. F. (1981). Testosterone: A major determinant of extragenital sexual dimorphism. *Science*, 211(4488), 1285–1294.
<https://doi.org/10.1126/science.7010603>
- Beaty, T. H., Hetmanski, J. B., Zeiger, J. S., Fan, Y. T., Liang, K. Y., VanderKolk, C. A., & McIntosh, I. (2002). Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genetic Epidemiology*, 22(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1002/gepi.1039>
- Blanton, S. H., Henry, R. R., Yuan, Q., Mulliken, J. B., Stal, S., Finnell, R. H., & Hecht, J. T. (2011). Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 91(1), 50–60. <https://doi.org/10.1002/bdra.20740>
- Bowman, B., & Russel, R. (2003). *Conocimientos actuales sobre nutrición* (Octava edición).
- Boyles, A. L., Wilcox, A. J., Taylor, J. A., Shi, M., Weinberg, C. R., Meyer, K., Fredriksen, A., Ueland, P. M., Johansen, A. M. W., Drevon, C. A., Jugessur, A., Trung, T. N., Gjessing, H. K., Vollset, S. E., Murray, J. C., Christensen, K., & Lie, R. T. (2009). Oral facial clefts and gene polymorphisms in metabolism of folate/one-carbon and vitamin A: A pathway-wide association study. *Genetic Epidemiology*, 33(3), 247–255.
<https://doi.org/10.1002/gepi.20376>
- Brito, L. A., Meira, J. G. C., Kobayashi, G. S., & Passos-Bueno, M. R. (2012). Genetics and Management of the Patient with Orofacial Cleft. *Plastic Surgery International*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/782821>
- Bulygina, E., Mitteroecker, P., & Aiello, L. (2006). Ontogeny of facial dimorphism and patterns of individual development within one human population. *American Journal of Physical Anthropology*, 131(3), 432–443.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.20317>

- Burg, M. L., Chai, Y., Yao, C. A., Magee, W., & Figueiredo, J. C. (2016). Epidemiology, Etiology, and Treatment of Isolated Cleft Palate. *Frontiers in Physiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00067>
- Carinci, F., Scapoli, L., Palmieri, A., Zollino, I., & Pezzetti, F. (2007). Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 71(10), 1509–1519. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2007.06.007>
- Chai, Y., & Maxson, R. E. (2006). Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 235(9), 2353–2375. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20833>
- Chowdhury, S., Hobbs, C., MacLeod, Stewart, Cleves, M., Melnyk, J. J., Hu, P., & Erickson, S. (2012). Associations between maternal genotypes and metabolites implicated in congenital heart defects. *Mol Genet Metab*. 2012 November ; 107(3): 596–604. doi:10.1016/j.ymgme.2012.09.022, 22. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.09.022>
- Cordell, H. J. (2009). Detecting gene–gene interactions that underlie human diseases. *Nature Reviews Genetics*, 10(6), 392–404. <https://doi.org/10.1038/nrg2579>
- Dayal, H. H. (1980). Additive excess risk model for epidemiologic interaction in retrospective studies. *Journal of Chronic Diseases*, 33(10), 653–660. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(80\)90008-9](https://doi.org/10.1016/0021-9681(80)90008-9)
- Dixon, M. J., Marazita, M. L., Beaty, T. H., & Murray, J. C. (2011). Cleft lip and palate: Understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews Genetics*, 12(3), 167–178. <https://doi.org/10.1038/nrg2933>
- Ellegren, H., & Parsch, J. (2007). The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 8(9), 689–698. <https://doi.org/10.1038/nrg2167>
- Eppley, B. L., van Aalst, J. A., Robey, A., Havlik, R. J., & Sadove, A. M. (2005). The spectrum of orofacial clefting. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 115(7), 101e–114e. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000164494.45986.91>

- Field, M. S., Anguera, M. C., Page, R., & Stover, P. J. (2009). 5,10-Methenyltetrahydrofolate synthetase activity is increased in tumors and modifies the efficacy of antipurine LY309887. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *481*(2), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.11.001>
- Field, M. S., Szebenyi, D. M. E., & Stover, P. J. (2006). Regulation of de Novo Purine Biosynthesis by Methenyltetrahydrofolate Synthetase in Neuroblastoma. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(7), 4215–4221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510624200>
- Field, M., Szebenyi, D., Perry, C., & Stover, P. (2007). *Inhibition of 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase*. file:///C:/Users/asus/Downloads/1-s2.0-S0003986106004954-main%20(4).pdf.
- Girgis, S., Suh, J., Jolivet, J., & Stover, J. (1997). 5-Formyltetrahydrofolate regulates homocysteine remethylation in human neuroblastoma. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Gritli-Linde, A. (2007). Molecular control of secondary palate development. *Developmental Biology*, *301*(2), 309–326. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.042>
- Hall, B. K. (1999). *The Neural Crest in Development and Evolution*. Springer Science & Business Media.
- Herrera M, J., Muñoz, A. M., & Parra S, B. E. (2016). Factores determinantes del estado nutricional del folato y el rol de la variante genética C677T de la enzima metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). *Revista chilena de nutrición*, *43*(4), 336–345. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182016000400001>
- Imbard, A., Benoist, J.-F., & Blom, H. J. (2013). Neural tube defects, folic acid and methylation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *10*(9), 4352–4389. <https://doi.org/10.3390/ijerph10094352>
- Jiang, R., Bush, J. O., & Lidral, A. C. (2006). Development of the Upper Lip: Morphogenetic and Molecular Mechanisms. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, *235*(5), 1152–1166. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20646>

- Kottgen, A., Kao, W. H. L., Hwang, S.-J., Boerwinkle, E., Yang, Q., Levy, D., Benjamin, E. J., Larson, M. G., Astor, B. C., Coresh, J., & Fox, C. S. (2008). Genome-wide association study for renal traits in the Framingham Heart and Atherosclerosis Risk in Communities Studies. *BMC Medical Genetics*, 9(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-9-49>
- Lee, K.-M., Lan, Q., Krickler, A., Purdue, M. P., Grulich, A. E., Vajdic, C. M., Turner, J., Whitby, D., Kang, D., Chanock, S., Rothman, N., & Armstrong, B. K. (2007). One-carbon metabolism gene polymorphisms and risk of non-Hodgkin lymphoma in Australia. *Human Genetics*, 122(5), 525–533. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0431-2>
- Li, K., Wahlqvist, M. L., & Li, D. (2016). Nutrition, One-Carbon Metabolism and Neural Tube Defects: A Review. *Nutrients*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/nu8110741>
- Mangold, E., Ludwig, K. U., & Nöthen, M. M. (2011). Breakthroughs in the genetics of orofacial clefting. *Trends in Molecular Medicine*, 17(12), 725–733. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.07.007>
- Mentch, S. J., Mehrmohamadi, M., Huang, L., Liu, X., Gupta, D., Mattocks, D., Gómez Padilla, P., Ables, G., Bamman, M. M., Thalacker-Mercer, A. E., Nichenametla, S. N., & Locasale, J. W. (2015). Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. *Cell Metabolism*, 22(5), 861–873. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.024>
- MINSAL. (2015). *Guía Clínica AUGÉ: Fisura Labiopalatina*. Ministerio de salud publica de chile.
- Misselbeck, K., Marchetti, L., Priami, C., Stover, P. J., & Field, M. S. (2019). The 5-formyltetrahydrofolate futile cycle reduces pathway stochasticity in an extended hybrid-stochastic model of folate-mediated one-carbon metabolism. *Scientific Reports*, 9(1), 4322. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40230-4>
- Mossey, P., & Little, J. (2009). Addressing the challenges of cleft lip and palate research in India. *Indian Journal of Plastic Surgery : Official Publication of*

- the Association of Plastic Surgeons of India*, 42(Suppl), S9–S18.
<https://doi.org/10.4103/0970-0358.57182>
- Mutsert, R. de, Jager, K. J., Zoccali, C., & Dekker, F. W. (2009). The effect of joint exposures: Examining the presence of interaction. *Kidney International*, 75(7), 677–681. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.645>
- Ober, C., Loisel, D. A., & Gilad, Y. (2008). Sex-Specific Genetic Architecture of Human Disease. *Nature reviews. Genetics*, 9(12), 911–922.
<https://doi.org/10.1038/nrg2415>
- Reference, G. H. (s. f.). *MTHFS gene*. Genetics Home Reference. Recuperado 11 de mayo de 2020, de <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFS>
- Rivera, C., & Arenas, M. J. (2013). *Bases ambientales y genéticas de las fisuras orofaciales: Revisión*. Journal of Oral Research.
<file:///C:/Users/asus/Downloads/Dialnet-BasesAmbientalesYGeneticasDeLasFisurasOrofaciales-4995369.pdf>
- Rodan, L. H., Qi, W., Ducker, G. S., Demirbas, D., Laine, R., Yang, E., Walker, M. A., Eichler, F., Rabinowitz, J. D., Anselm, I., & Berry, G. T. (2018). 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase deficiency causes a neurometabolic disorder associated with microcephaly, epilepsy, and cerebral hypomyelination. *Molecular Genetics and Metabolism*, 125(1), 118–126.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.06.006>
- Sakthivel, D., Lei, Y., Cao, X., & Finnell, R. (2020). Homozygous mutation in the MTHFS gene may contribute to the development of cerebral folate deficiency syndrome. *Reproductive and Developmental Medicine*, 4(2), 72.
<https://doi.org/10.4103/2096-2924.288022>
- Salamanca, C., González-Hormazába, P., Recabarren, A., Recabarren, P., Pantoja, R., & Suazo, J. (2019). *A SHMT1 variant decreases the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in Chile*.
<https://doi.org/10.1111/odi.13229>
- Santos, J. L., Pérez, F., Carrasco, E., & Albala, C. (2002). Uso de tríos caso-padres en estudios epidemiológicos de asociación entre polimorfismos genéticos y enfermedades complejas. *Revista médica de Chile*, 130(11),

- 1307–1315. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872002001100016>
- Sharp, G., Stergiakouli, E., Sandy, J., & Relton, C. (2018). *Epigenetics and Orofacial Clefts: A Brief Introduction*.
[file:///C:/Users/asus/Downloads/Sharp%202017%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/asus/Downloads/Sharp%202017%20(1).pdf)
- Shaw, G. M., Yang, W., Perloff, S., Shaw, N. M., Carmichael, S. L., Zhu, H., & Lammer, E. J. (2013). Thymidylate synthase polymorphisms and risks of human orofacial clefts. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, *97*(2), 95–100. <https://doi.org/10.1002/bdra.23114>
- Shkoukani, M. A., Chen, M., & Vong, A. (2013). Cleft Lip – A Comprehensive Review. *Frontiers in Pediatrics*, *1*. <https://doi.org/10.3389/fped.2013.00053>
- Spielman, R. S., McGinnis, R. E., & Ewens, W. J. (1993). Transmission test for linkage disequilibrium: The insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *American Journal of Human Genetics*, *52*(3), 506–516.
- Suazo, J., Tapia, J. C., Santos, J. L., Castro, V. G., Colombo, A., & Blanco, R. (2011). Risk variants in BMP4 promoters for nonsyndromic cleft lip/palate in a Chilean population. *BMC Medical Genetics*, *12*(1), 163.
<https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-163>
- Thompson, H. R., Jones, G. M., & Narkewicz, M. R. (2001). Ontogeny of hepatic enzymes involved in serine- and folate-dependent one-carbon metabolism in rabbits. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *280*(5), G873–G878.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.5.G873>
- VanderWeele, T., & Knol, M. (2014). *A Tutorial on Interaction*. *Epidemiol. Methods* *2014*; *3*(1): 33–72, 33–72. [https://doi.org/DOI 10.1515/em-2013-0005](https://doi.org/DOI%2010.1515/em-2013-0005)
- Wang, Y.-W., Zhang, S.-D., Xue, W.-J., Zhu, M.-L., & Zheng, L.-Z. (2015). SHMT1 C1420T polymorphism contributes to the risk of non-Hodgkin lymphoma: Evidence from 7309 patients. *Chinese Journal of Cancer*, *34*.
<https://doi.org/10.1186/s40880-015-0065-z>
- Wilcox, A. J., Lie, R. T., Solvoll, K., Taylor, J., McConaughy, D. R., Abyholm, F., Vindenes, H., Vollset, S. E., & Drevon, C. A. (2007). Folic acid supplements

and risk of facial clefts: National population based case-control study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 334(7591), 464.

<https://doi.org/10.1136/bmj.39079.618287.0B>

Zhao, J., Jin, L., & Xiong, M. (2006). Test for interaction between two unlinked loci.

American Journal of Human Genetics, 79(5), 831–845.

<https://doi.org/10.1086/508571>

ANEXOS.

Anexo 1: Acta de Aprobación Comité Ético Científico de Proyecto "NONSYNDROMIC OROFACIAL CLEFTS IN CHILE: THE ROLE OF PARENTAL BIOMARKERS OF FOLATE/ONE-CARBON METABOLISM".



Ed-30 de mayo de 2017

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

INFORME N°:2017/07

Acta de Aprobación de Proyecto "NONSYNDROMIC OROFACIAL CLEFTS IN CHILE: THE ROLE OF PARENTAL BIOMARKERS OF FOLATE/ONE-CARBON METABOLISM"

1. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dr. Eduardo Fernández
Presidente CEC

Dr. Marco Comejo
Vicepresidente CEC

Dr. Mauricio Baeza
Miembro Permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro Permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro Permanente CEC

Sra. Rebeca Galarce
Miembro Permanente CEC

Dr. Juan Estay
Miembro Permanente CEC

Dra. Viviana Toro
Miembro Alterno CEC

Dr. Ignacio Araya
Miembro Alterno CEC

2. Fecha de Aprobación: 30/05/2017

Titulo completo del proyecto: "NONSYNDROMIC OROFACIAL CLEFTS IN CHILE: THE ROLE OF PARENTAL BIOMARKERS OF FOLATE/ONE-CARBON METABOLISM"

3. Investigador responsable: Dr. José Suazo

4. Institución Patrocinante: Facultad de Odontología – Universidad de Chile

5. Documentación Revisada:

- Proyecto
- Consentimiento Informado (CI)
- Currículo del investigador responsable y coinvestigadores
- Nómina de los coinvestigadores y colaboradores directos de la investigación.

6. Fundamentación de la aprobación

Este proyecto es aprobado luego que se realizarán las modificaciones en relación a los siguientes aspectos metodológicos y éticos:

- Especificar el criterio de inclusión para el grupo control.
- Realizar correcciones ortográficas y gramaticales en el Consentimiento Informado

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado **"NONSYNDROMIC OROFACIAL CLEFTS IN CHILE: THE ROLE OF PARENTAL BIOMARKERS OF FOLATE/ONE-CARBON METABOLISM"**



Dr. Eduardo Fernández G.

Presidente C.E.C.



c/c.: Investigador Principal y Secretaría C.E.C.

Anexo 2: Consentimiento Informado.



Versión 2 16/03/2017

Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación

Título del Protocolo: NONSYNDROMIC OROFACIAL CLEFTS IN CHILE: THE ROLE OF PARENTAL BIOMARKERS OF FOLATE/ONE-CARBON METABOLISM

PATROCINANTE: Concurso FONDECYT Regular 2017

Nombre del Investigador principal: Dr. José Suazo Sanhueza
R.U.T.: 13.033.606-K
Institución: Instituto de Investigación en Ciencias Odontológica, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Sergio Livingstone # 943. Independencia, Santiago.

Teléfono: 229781758

Nombre del Participante:

.....

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará tanto a casos afectados por fisuras orofaciales (labio leporino y/o paladar fisurado), sus progenitores o tutores, y consta de dos partes:

- Infomación (proporciona información sobre el estudio para usted).
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).
- Formulario de Asentimiento (menores entre 14 y 18 años).

Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es José Suazo Sanhueza y soy profesor de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación cuyo objetivo es conocer las causas genéticas y ambientales de este problema de nacimiento conocido como fisuras orofaciales, también conocidas como labio leporino y paladar fisurado. En otras palabras, intentamos averiguar cuál es el origen hereditario de esta enfermedad y si hay alguna causa, por ejemplo, de origen nutricional.

Le proporcionaré información y lo invitaré a ser parte de este proyecto. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la Investigación y si usted desea participar, se le solicitará que firme este formulario.

Pági

Justificación de la Investigación

En Chile nacen muchos niños y niñas con problemas en la formación de su labio o paladar conocido como fisuras orofaciales. El problema es que aun no sabemos totalmente porque aparece. Lo que sabemos es que muchas veces se observa en familias, por lo que creemos podría ser una malformación hereditaria y que puede tener que ver con falta de algunos nutrientes. Por eso este estudio buscará factores hereditarios y ambientales que pueden participar en la aparición de este problema de nacimiento.

Objetivo de la Investigación

Esta investigación tiene por objetivo conocer las causas genéticas y ambientales de este problema de nacimiento conocido como fisuras orofaciales. En otras palabras, averiguar cuál es el origen tanto hereditario como nutricional de esta enfermedad. Específicamente buscaremos si existen cambios en factores genéticos (o genes) que participan en la formación de la cara cuando se está desarrollando el feto durante el embarazo. Además queremos averiguar si la falta de un nutriente (llamado folato) tiene relación con este defecto. Para ello necesitamos una muestra de su material genético o ADN y de su plasma (parte líquida de la sangre), además de una encuesta sobre los alimentos que ha consumido en los últimos meses. Este estudio incluirá a un grupo de al menos 250 personas con este problema y sus madres y padres. Dado que usted o su hija o hijo tiene estas características es que lo estamos invitando a participar.

Beneficio de la Investigación.

Usted no se beneficiará por participar en esta investigación médica. Sin embargo, la información que se obtendrá será de utilidad para conocer más acerca de este problema de nacimiento. Esto podría, eventualmente en el futuro, beneficiar a muchas familias con esta condición.

Tipo de Intervención y Procedimiento.

Si Ud. acepta participar en este estudio se les realizará una encuesta para recopilar información básica de contacto (nombre, domicilio, teléfono de contacto) y sobre su familia (como si hay casos de este problema o similares) y se les solicitará, sólo por una vez, una pequeña muestra de 5 ml de sangre (lo que equivale a una cuchara de té). Además a los padres se le hará una encuesta sobre los alimentos y sus porciones que ha consumido en los últimos 6 meses. En el caso de los niños pequeños, se tomará de 2 ml saliva (lo que equivale a menos de una cuchara de té) o de la parte interior de su mejilla (que se toma con una especie de cotonito de algodón). En el caso de su hija o hijo recién nacido, se tomará una muestra de sangre de 5 ml del cordón umbilical. Todos estos procedimientos sólo tomarán algunos minutos.

Desde la sangre y saliva se extraerá el material genético que será analizado en nuestro laboratorio. La muestra de sangre de los recién nacidos y de los padres también se usará para medir componentes llamados folatos.

Sus datos y la muestra de su material genético y sangre serán usadas única y exclusivamente para el propósito de esta investigación y no se harán otros estudios genéticos. Las muestras serán almacenadas por un máximo de 15 años, en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, bajo la responsabilidad del Dr. José Suazo. Si en el futuro son usadas para propósitos diferentes a los de esta investigación médica, se le contactará para solicitar que nos autorice a usarla firmando un nuevo consentimiento.

Riesgo de la Investigación.

La toma de una muestra de sangre de la vena tiene riesgos mínimos para su salud, tales como dolor en el sitio de punción, hematomas (moretones) y rara vez infección en el sitio de punción. Para evitar este tipo de molestia la persona que extraerá la muestra tiene experiencia en el procedimiento. Por ello los riesgos para usted son mínimos. En el caso de la toma de muestra de sangre de cordón del recién nacido, este es un procedimiento de rutina en cada parto que no

implica riesgo alguno para el niño(a) ni para la madre. En el caso de la muestra de saliva o de la mejilla no genera ningún problema para su salud, no produce dolor ni posibilidad de infección. Por ello los riesgos para usted son mínimos.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Los criterios de inclusión serán: ser chileno y presentar el diagnóstico de fisuras orofaciales no acompañadas de otras anomalías incluyendo sus padres y madres biológicas.

Los criterios de exclusión serán: chilenos o extranjeros con otras anomalías del desarrollo craneofacial que no correspondan a estas malformaciones o que estén asociadas a síndromes.

Confidencialidad y difusión de datos.

La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de participantes (datos personales y los resultados de los estudios genéticos y sanguíneos), será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. El nombre y datos personales de usted o su hijo(a) serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas, pero su nombre no será conocido.

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención y/o participación.
- Toda información que se extraiga de su ficha clínica será extraída por el profesional quien ha realizado su tratamiento desde que usted o su hija/hijo ingresó a este centro y no por otra persona.
- Si usted decide puede retirarse del estudio cuando lo desee.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.

Otros Derechos del participante

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del Comité Ético Científico, Dr. Eduardo Fernández G., Teléfono: 229781742, Email: cec.fouch@odontologia.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada en el tercer piso del Edificio Administrativo de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile en calle Sergio Livingstone 943, Comuna de Independencia.



Carta de Consentimiento Informado (Mayores de 18 años)

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente, y en consecuencia, acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. He sido informado(a) y comprendo la necesidad y fines de ser atendido.
3. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
4. Conozco los beneficios de participar en la Investigación
5. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
6. Además de esta información que he recibido, seré informado(a) en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
7. Autorizo a usar mi caso para investigación y para ser usado como material audiovisual en clases, protegiendo mi identidad
8. En caso de cualquier duda puede comunicarse con el Dr. José Suazo Sanhueza a los números 29781758 o 56679342 o dirigirse al Presidente del Comité Ético Científico, Dr. Eduardo Fernández G., Teléfono: 229781742, Email: cec.fouch@odontologia.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada en el tercer piso del Edificio Administrativo de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile en calle Sergio Livingstone 943, Comuna de Independencia.



Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente.

Nombre del Paciente, Padre Tutor: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____



Nombre del Director del establecimiento donde realiza la investigación o de su representante _____

Firma: _____

Fecha: _____

Asentimiento (mayores de 14 años y menores de 18 años)

Somos investigadores de la Universidad de Chile y queremos invitarte a participar de un estudio que quiere saber porque se produce el problema de nacimiento que tu y otros niños y niñas presentan y que tiene que ver con la formación de la cara. Para ello te preguntaremos algunos datos a ti o a tu mamá o a tu papá y te pediremos que nos des un poco de tu sangre o de saliva en un tubo o un pequeño raspado de la parte de adentro de tu mejilla. Esto para estudiar el material genético de tus células (conocido como ADN) y saber si hay algún cambio que pueda estar produciendo tu condición.

Sacar la sangre puede producir un poco de dolor, pero la muestra de saliva no produce dolor ni molestias. Estos procedimientos son rápidos y tu familia no tendrá que pagar nada. Si decides participar, tu ayuda nos hará tener información para ayudar en el futuro a otras personas con tu condición.

Ten siempre en cuenta que tu participación es voluntaria, es decir, que nadie puede obligarte a participar. Si decides no aceptar tampoco tendrás problemas con el tratamiento que estas siguiendo en este lugar.

Si no tienes preguntas que hacer o todas han sido respondidas claramente, puedes llenar los datos más abajo y poner tu firma.

Muchas gracias.

Nombre del Paciente: _____

Firma: _____

Fecha: _____



Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Nombre del Investigador Principal:

Firma: _____

Fecha: _____

Nombre del Director del establecimiento donde realiza la investigación o de su representante

Firma: _____

Fecha: _____

Anexo 3: Aprobación del Comité de Bioseguridad.



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°99

Santiago, 09 de Marzo de 2017.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación Fondecyt Regular N°1170805 (2017), titulado "Nonsyndromic Orofacial Clefts in Chile: The Role of Parental Biomarkers of Folate/One-Carbon Metabolism". El Investigador Responsable de este proyecto es el Profesor Dr. José Suazo Sanhueza, Académico del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad Odontología.

Las muestras de sangre y cordón umbilical serán tomadas de sujetos provenientes de los centros de salud mencionados en la metodología del proyecto. Las muestras serán manipuladas para extracción de ADN en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Odontología. El personal técnico que manipulará las muestras se encuentra debidamente entrenado en esta área. Además, ellos estarán bajo la supervisión del Dr. Suazo.

El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Suazo para ser presentado en el Concurso Fondecyt Regular 2017 (Conicyt).

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta

