

**“ESTUDIO DE ASOCIACION ENTRE UN  
MICROSATELITE DEL GEN EDN 1,  
UBICADO EN EL CROMOSOMA 6, Y LA  
FISURA IABIOPALATINA NO SINDROMICA  
EN UNA POBLACION CHILENA”.**

Trabajo de Investigación para optar al título de Tecnólogo Médico mención Bioanálisis Clínico,  
Hematología y Banco de Sangre.

**José Lorenzo Suazo Sanhueza.**

Tutores: BQ Hernán Carreño, Prof. Dr. Rafael Blanco.


**1999**



Calificaciones .	1
..	5
AGRADECIMIENTOS .	7
RESUMEN .	9
INTRODUCCION .	11
OBJETIVOS ..	19
OBJETIVO GENERAL .	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS .	19
HIPOTESIS .	21
MATERIALES Y METODOS .	23
RESULTADOS ..	25
SIMBOLOGIA CUADROS RESUMEN ..	32
DISCUSION .	35





## Calificaciones



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA**

EVALUACION FINAL

La Tesis Profesional para obtener el Título Profesional de Tecnólogo Médico en la Especialidad: Diagnóstico Clínico, Hematología y Banco de Sangre, titulada: "ESTUDIO DE ASOCIACION ENTRE UN MICROSATELITE DEL GEN EDN 1, UBICADO EN EL CROMOSOMA 6, Y LA FISURA LABIOPALATINA NO SINDROMICA EN UNA POBLACION CHILENA", así como el desarrollo del alumno que lo realizó, Sr. José Suazo Sanhueza, han sido calificadas con una final 7.0 (siete puntos cero)

  
 Prof. M. Soledad Barrios  
 Presidente Comité Académico de Tesis Profesionales



  
 Prof. M. Enrique Vera-Lucena  
 Director Escuela de Tecnología Médica

Santiago, Agosto 12 de 1999

**“ESTUDIO DE ASOCIACION ENTRE UN MICROSATELITE DEL GEN EDN 1, UBICADO EN EL CROMOSOMA 6, Y LA FISURA LABIOPALATINA NO SINDROMICA EN UNA POBLACION**

Santiago 6 de Agosto de 1999


Prof. T. M. Patricia Vega Leiva  
Director  
Escuela de Tecnología Médica  
Prof. T. M. Soledad Berríos  
Presidente Comité Académico de Tests Profesional

Estimados Director y Presidente:

He examinado el Trabajo de Investigación “ESTUDIO DE ASOCIACION ENTRE UN MICROSATELITE DEL GEN EDN 1, UBICADO EN EL CROMOSOMA 6, Y LA FISURA LABIOPALATINA NO SINDROMICA EN UNA POBLACION CHILENA” del alumno José L. Suazo S. de la Mención Bioanálisis Clínico, Hematología y Banco de Sangre.

Este trabajo cumple con todas las condiciones de una investigación científica en forma actualizada y precisa y denota una dedicación esmerada y un trabajo enorme. Por estas propiedades de la investigación, junto con felicitar al alumno y futuras exitosas de este trabajo con nota 7.

Cordialmente

  
Carlos Valenzuela Y.  
Profesor Titular, revisor

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

Santiago, 10 de agosto de 1999

Se  
Prof. Patricio Vega L.  
Director  
Escuela de Tecnología Médica  
P R E S E N T E

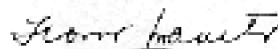
Estimado Prof. Vega:

Después de haber analizado el Trabajo de Investigación "ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE UN MICROSATELITE DEL GEN EDN 1, UBICADO EN EL CROMOSOMA 6, Y LA POSITRA LAHIDROPALATINA NO SIMILAR EN UNA POBLACION CHILENA", realizado por el alumno José Suazo S. de la Merced, Especialista Clínico, Hematología y Banco de Sangre, puedo señalar lo siguiente:

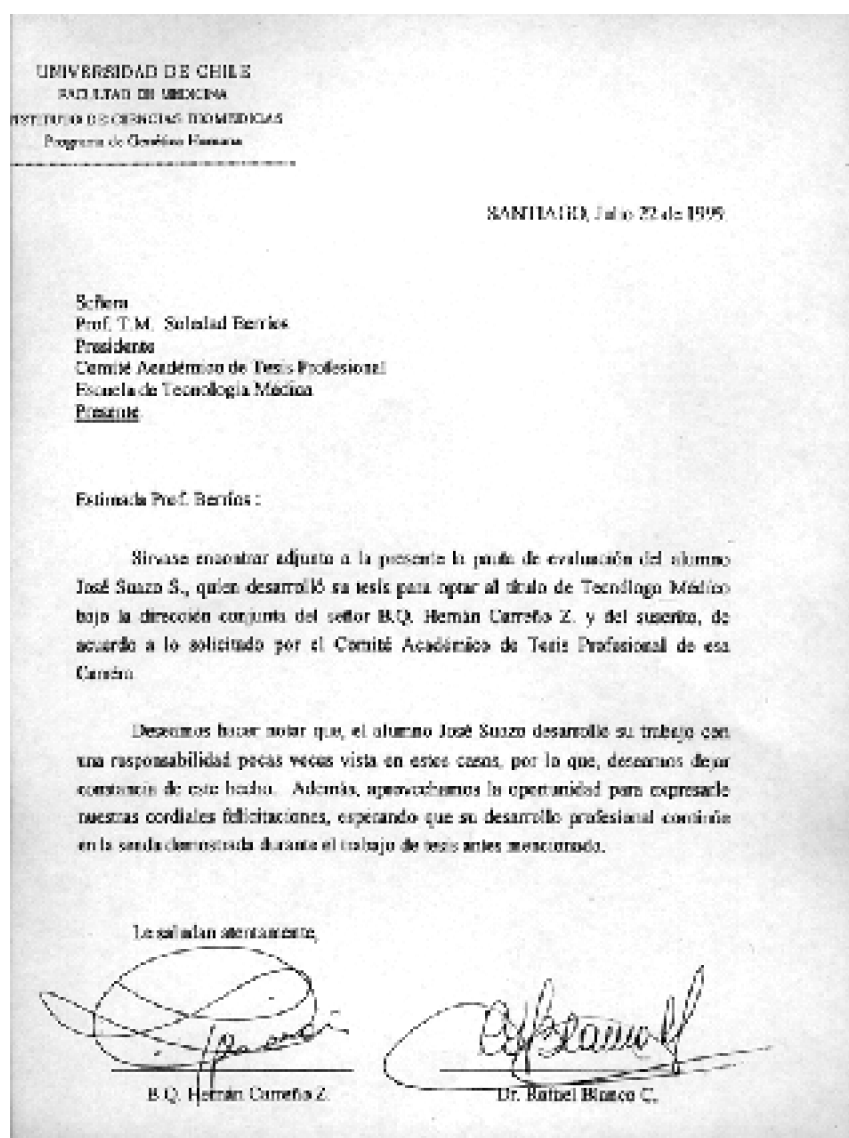
1. El trabajo cumple adecuadamente con la aplicación del método científico.
2. La hipótesis y objetivos están claramente enunciados, existiendo coherencia entre ellos.
3. Los materiales y métodos utilizados en el presente trabajo están bien definidos y explicados, pero sería importante describir a la descripción por caso de la muestra (número) y el nivel de contaminación de los familiares incluidos en el estudio.
4. La presentación de resultados es clara y adecuada.
5. La discusión está en relación con los resultados obtenidos.
6. El desarrollo de la metodología presentada en esta Tesis es un aporte a la disciplina.
7. Como que podría mejorar la presentación formal de este trabajo, le indico un sujeción de una fotografía de un gel en que se observen las bandas correspondientes a sitios del gen estudiado en el presente estudio.
8. Existen algunas convenciones formales señaladas en el lista que es necesario realizar.

Por lo anteriormente expuesto, este trabajo merece una nota (7).

Sin otro particular lo saluda atentamente:

  
T.M. Lorenz Armuzzi B.  
Fonista  
Tecnología Médica

**“ESTUDIO DE ASOCIACION ENTRE UN MICROSATELITE DEL GEN EDN 1, UBICADO EN EL CROMOSOMA 6, Y LA FISURA IABIOPALATINA NO SINDROMICA EN UNA POBLACION**





---

*A Don José María... ...el “Maestro Vegetal”*



## AGRADECIMIENTOS

Después de varios meses de esfuerzo, al terminar este trabajo de investigación quisiera agradecer a mis tutores el señor B.Q. Hernán Carreño y al Dr. Rafael Blanco, y a Mónica Paredes, del laboratorio de Genética del Desarrollo, por su constante dedicación, ayuda y comprensión. También quiero agradecer a Elvira, mi Madre y a Sylvia y Jenny, mis Hermanas por su incondicional apoyo y por todo el amor y fuerza entregado. Por último, agradezco a mis amigos y compañeros, y a María Fernanda, una persona muy especial que me ha dado toda su energía y cariño para seguir adelante.

Este trabajo está dedicado a la memoria de mi Padre, amigo y compañero, José María, principal gestor de cada logro en mi vida y eterno protector de mi existir



## RESUMEN

Dada la importancia de la malformación fisura labiopalatina (FL(P)), se ha estudiado desde hace varias décadas, la etiología y su genética. En el caso de la fisura labiopalatina no sindrómica, se han postulado diferentes modos de herencia, siendo en la actualidad el modelo oligogénico el más aceptado. En este trabajo se estudia la asociación entre alelos de un microsatélite del gen EDN1(6p24.1) (obtenidos mediante la técnica de PCR), con la FL(P) no sindrómica. Mediante PCR se obtienen amplificados que se separan por electroforesis en geles de poliacrilamida y posterior tinción de plata.

La población en estudio se separó en cinco grupos distintos: uno de fisurados Simplex (FSx, fisurados que provienen de una familia que presenta un solo caso), uno de fisurados Multiplex (FMx, fisurados que presentan mas de un caso en la familia), los familiares sanos de los fisurados tanto Simplex como Múltiplex y un grupo control. Se analizaron las frecuencias de los once alelos que presenta este marcador en cada grupo en estudio para confrontarlos, mediante el análisis estadístico de  $\chi^2$  con la población control que no presenta antecedentes familiares de FL(P).

Los resultados muestran que los fisurados no difieren de los controles. Sin embargo, el grupo de los familiares múltiplex y particularmente el de los familiares múltiplex varones, presentan diferencias significativas en comparación con los controles. Esto nos permitiría concluir que existiría una relación indirecta entre EDN1 y la FL(P) no sindrómica, la que se traduce en el dimorfismo sexual observado. Los resultados de esta Tesis apoyarían el modelo oligogénico de herencia con una hipótesis de heterogeneidad genética, ya que sugiere la necesidad de la presencia de otros loci para la permanencia de dicha fisura.



# INTRODUCCION

Las malformaciones craneofaciales ocupan el tercer lugar dentro de las malformaciones congénitas denominadas mayores, después de las malformaciones de extremidades inferiores y las cardiopatías congénitas, de acuerdo a cifras del Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC) (Meneghello, 1997). En las alteraciones craneofaciales encontramos las dismorfías craneofaciales y las fisuras craneofaciales, en donde se ubican las fisuras labiopalatinas (FL(P)). En Chile, la tasa de la fisura labiopalatina se registra como la tercera en frecuencia (1.2 por mil nacidos vivos), precedida por el Síndrome de Down (1.73/1000) y la polidactilia (1.26/1000) (Nazer et al., 1997).

En el proceso normal de la formación de la cara en humanos, el embrión presenta una estructura anterosuperior llamada estomodeo, desde la cual, en la cuarta semana de gestación, se producen cinco estructuras llamadas procesos: dos procesos mandibulares, dos maxilares y uno frontonasal, derivadas del primer par de arcos braquiales o faríngeos y producidas por la proliferación de células de la cresta neural. Al final de la sexta semana se fusionan los procesos nasales laterales con los procesos maxilares, formándose el borde de la nariz y la mejilla. Entre la séptima y décima semanas se fusionan las prominencias nasales entre sí con las prominencias maxilares y nasales laterales. La unión de las prominencias nasales mediales origina el surco vertical del labio y el paladar primario, y las partes laterales del labio y el paladar secundario se forman a partir de las prominencias nasales. Todos estos procesos dependen de la continua degradación de los epitelios superficiales de contacto e infiltración de tejido mesenquimático. Alteraciones en la fusión de los procesos frontonasaes laterales con el proceso maxilar producirán la

fisura labiopalatina. Esta fisura (lateral o bilateral) dependerá de la falta de fusión de uno o los dos procesos frontonasaes laterales con el maxilar (Moore, 1997).

En las fisuras cráneo-faciales encontramos las fisuras labiopalatinas (FL(P)) y la fisura palatina aislada (FP), de las cuales se sabe que son entidades etiológicamente diferentes. Las FL(P) pueden también estar o no asociadas a un síndrome, es decir, que además de la fisura aparecen otras afecciones congénitas. Entre un 50% a 70% de estas corresponden a formas no sindrómicas, y las formas sindrómicas, a más de 300 entidades reconocibles. Numerosos síndromes incluyen deficiencias cognitivas o anomalías estructurales acompañando a la fisura, para algunos de las cuales, se han identificado localizaciones citogenéticas, genes o factores involucrados en forma específica. Algunos ejemplos de estos síndromes incluyen el síndrome de Van der Woude (1q32), el síndrome de Treacher Collins (5q), holo-prosencefalia, displasia distrófica, etc. (Gorlin, 1990).

La frecuencia de estas malformaciones varía de acuerdo a las diferentes poblaciones del mundo. Es así como en Europa se registran tasas de 1.62 casos por mil nacidos vivos, en Asia de 2.0, en Africa de 0.9 y en América de 1.36 casos por mil nacidos vivos (Meneghello, 1997). En el caso de Chile, un estudio realizado por Palomino et al. (1997), sobre FL(P) y FP, reporta una tasa de fisura de 1,53 casos por mil nacidos vivos, donde el 83% (1,27 casos por mil nacidos vivos) corresponde a FL(P) y el 17% restante (0,26 por mil nacidos vivos) corresponde a FP. En este estudio se revela la influencia de la mezcla indígena en la permanencia del fenómeno fisura. Analizando casos de recién nacidos afectados procedentes de sectores de nivel socioeconómico alto y otros de nivel socioeconómico bajo de Santiago, nacimientos en clínicas privadas y hospitales públicos respectivamente, se aprecia que a mayor nivel de mezcla indígena aumenta la ocurrencia de fisuras labiopalatinas. Esto mismo se encuentra en poblaciones del norte y sur de nuestro país, es decir, a mayor nivel de mezcla indígena mayor ocurrencia de fisuras labiopalatinas en comparación con las menores frecuencias y bajo nivel de mezcla indígena de los sectores de alto nivel socioeconómico de nuestra capital.

Respecto al modo de herencia de la FL(P) no sindrómica, aún no se ha aclarado, pero se han postulado diversos modelos que lo explicarían y se resumen en la tabla N°1.

En 1989 se establece un enfoque molecular dirigido a encontrar en gen mayor involucrado en la expresión de la fisura labiopalatina no sindrómica, con el trabajo de Ardinger et al., en relación a la asociación de dos RFLPs correspondientes al locus del gen TGFA (Transforming Growth Factor Alfa) y la ocurrencia de fisura, donde los autores sugieren que el gen TGFA o secuencias adyacentes a este locus, contribuyen al desarrollo de algunos casos de FL(P) no sindrómica. Pero en un estudio de ligamiento con siete familias afectadas no se observó un resultado positivo (Hecht et al 1990). En estudios posteriores, desde 1992 a 1995, se ha encontrado tanto una asociación positiva como negativa así como ligamiento positivo y negativo con el locus TGFA. (Tabla N°2).

Luego, aparece una serie de estudios con genes candidatos, buscando asociación o ligamiento con FL(P) no sindrómica, ubicados en diferentes cromosomas, la mayoría de los cuales arrojaron resultados negativos y que se ubican en los cromosomas 1p, 2p, 4p, 5q, 6p, 7q, 8q, 9q, 10p, 11p, 12p, 12q, 15q y 18q. Sólo unos pocos loci postulados como



---

candidatos a gen mayor, dieron resultados satisfactorios, entre los cuales encontramos los cromosomas 2p, 4q, 6p, 17q y 19q (Tabla N°2).

Todos estos loci corresponden a regiones Microsatélites. Este término nace al observar el DNA de eucariontes luego de centrifugarse en una gradiente de cloruro de cesio. Aparece una gran banda que representa la porción principal del DNA y además, hay tres bandas adicionales, que fueron llamadas satélites. De estas se distinguen: DNA satélites clásicos, formados por repeticiones de secuencias de 100-6500 pb; los minisatélites, con repeticiones de 10-20 pb y los microsatélites con repeticiones de 1-4 pb. Este último es la forma más frecuente de DNA repetitivo, presentando secuencias ricas en AT y CG, ubicándose entre sitios de restricción, con repeticiones en tándem y con un modo de herencia codominante simple (Passarge, 1995).

En esta búsqueda de un gen mayor (o uno de los genes mayores) involucrados en la etiología de la FL(P) no sindrómica, una serie de investigadores han enfocado su trabajo en loci del brazo corto del cromosoma 6 (6p). Por ejemplo, Eiberg et al., en 1987, sugieren ligamiento de un locus mayor para fisura con el gen del factor 13A (F13A) ubicado en 6p24-p25, lo que posteriormente sería refutado por Hecht et al., en 1993, que en su estudio no registraron evidencia de ligamiento de la FL(P) no sindrómica con F13A y tampoco con HLA, que también fue incluido en su estudio.

Carinci et al., en 1995, encontraron un ligamiento positivo del marcador D6S89 con la FL(P) no sindrómica, pero ligamiento negativo con F13A, EDN1, D6S105 Y D6S109, todos ubicados en 6p. Pero Blanton et al., en 1995, además del ligamiento negativo para F13A y D6S105, también lo encontraron para D6S89. En 1995, Davies et al., trabajando con tres casos de pacientes en los cuales se presentaban fisuras orofaciales, además de otras afecciones faciales, utilizaron clones del cromosoma 6 en YACs (Yeast Artificial Chromosomes), en dos casos se detectaron traslocaciones balanceadas de 6p23 (un caso con 7q36.1 y el otro con 9q22.3), y el tercer caso presentaba una deleción desde 6p23 a 6pter. Todo ello sugiere la influencia de la zona 6p23-p24 en la etiología de las fisuras orofaciales en el humano.

Como los estudios de ligamiento han arrojado resultados aparentemente contradictorios, en el último tiempo se ha optado por los estudios de asociación, en los cuales se busca significancia estadística entre la presencia de uno o más alelos de un locus determinado, con la aparición del fenómeno fisura. Esto debido a que los análisis de ligamiento se enfocan hacia la detección de un gen mayor en la etiología de la FL(P) no sindrómica. Además, en Chile Blanco et al., en 1998a, al estudiar la asociación del gen MSX1 (4p16.1-16.3) con FL(P) no sindrómica, incluyeron la diferenciación entre los individuos afectados con historia familiar (Múltiplex), es decir, con otro familiar afectado, y entre los individuos sin historia familiar (Simplex). Esto en base a la variabilidad de resultados obtenidos para un mismo marcador, en poblaciones étnicamente homogéneas, en donde no se estableció esta diferenciación genealógica. Los resultados de este estudio demostraron que esta no era sólo una diferencia genealógica, sino también se trata de grupos genéticamente distintos. El mismo grupo de investigadores incluyó, también en 1998, la diferenciación de sexos para el mismo marcador, además de las separaciones genealógicas ya citadas, donde encontraron que los varones fisurados y sus familiares fisurados se diferenciaban de los varones controles debido a las

frecuencias conjuntas de los alelos 2 y 4, en cambio las familiares mujeres difieren de las mujeres controles debido a las frecuencias conjuntas de los alelos 1 y 4. Esto sugiere que también existe un componente sexual en la relación de MSX1 con la FL(P) (Blanco et al., 1998b). Un reciente estudio de asociación de Carreño et al (1998) con marcadores de 6p, D6S105 y D6S89, ambos teloméricos a HLA, muestra una asociación significativa con los familiares múltiplex para D6S105. En D6S89 esta significancia se hace más importante y se agregan los fisurados múltiplex también con significancia considerable. Estos resultados sugieren que la mantención de la fisura dependería de la interacción de varios loci, sin que ninguno explicara por sí sólo el fenómeno fisura, que es lo que postula el modelo oligogénico e iría en contra del modelo de gen mayor.

La endotelina 1 es un péptido con potentes propiedades vasoactivas, específicamente vasoconstrictoras, expresado predominantemente en el epitelio y mesénquima de la faringe y en el endotelio, aparentemente relacionada con patologías como el asma y la hipertensión. Basados en modelos experimentales en ratón, Thomas et al., en 1998, detectaron que embriones con mutación en el gen *Edn1* (análogo de EDN1, gen de la endotelina 1 del humano), presentaban una disminución en la expresión de otros genes como el *dHAND*, que a su vez regula la expresión de MSX1. Este último es un gen relacionado con la regulación del desarrollo embrionario y también involucrado en la etiología de la FL(P) no sindrómica (Blanco et al., 1998a). Berge et al. (1992), estudiaron un RFLP para el gen EDN1, usando la enzima de restricción TaqI. Estos autores concluyeron que no existía relación entre el genotipo de este polimorfismo y la presión diastólica o sistólica registrada en un grupo de individuos sanos. Además, utilizando modelos animales, como ratones knockout para el gen de la endotelina 1, Morita et al., en 1999, observaron que los ratones sin un gen EDN1 (+/-), presentaban menores niveles renales de endotelina 1 (alrededor de un 50% menos) en relación a los ratones normales para EDN1 (++) con una dieta normal de sal. Pero si se producía una fuerte carga de sal en la dieta, esta notoria disminución de los niveles renales de endotelina 1 se registraba en ambos tipos de ratones. En este último caso no afectó el volumen plasmático circulante, los electrolitos plasmáticos, el clearance de la creatinina o la presión sanguínea sistémica, sólo aumentó la excreción urinaria de sodio. En base a esto, concluyeron que cambios fisiológicos en la producción de endotelina 1 no afectan la presión sanguínea sistémica, ni tampoco el metabolismo de las catecolaminas en cargas de sal en la dieta.

Dada la significancia de la asociación entre D6S105 y la FL(P) no sindrómica obtenida por Carreño et al. (1998), la cual se hacía más importante cuando el marcador se ubicaba más hacia el telómero, como es el caso de D6S89, se espera en este trabajo, que esta asociación se mantenga con el gen EDN1 (6p24.1), que se encuentra muy cercano a D6S105, en un estrecho ligamiento con D6S89 y telomérico a ambos (Hoehe et al., 1993). Si a estas evidencias le sumamos la relación entre EDN1 y MSX1, descrita por Thomas et al., en 1998, expresando el papel de ambos genes en el desarrollo embrionario, que participarían en una cascada, en que la expresión de MSX1 dependería de EDN1, y conociendo el rol de MSX1 en la etiología de la fisura sugerido por Blanco et al. (1998), se pueden sustentar los argumentos para establecer la posible relación de EDN1 en la etiología de la FL(P) no sindrómica, lo cual es objetivo de este trabajo.

Además, podemos agregar que en estudios con EDN1 de cerdos, se sugiere que la expresión de este gen es controlada por productos de protooncogenes como Fos, Jun y TGF $\beta$ , este último también ha sido postulado por algunos autores como un gen involucrado en la etiología de fisura, lo que a futuro sería interesante de analizar, luego de comprobar la relación de EDN1 con la FL(P). Por lo tanto, se estudia, en este trabajo, la asociación de un microsatélite de la región 5' de un exón del gen EDN1 con la FL(P) no sindrómica. Este polimorfismo de repetición es un microsatélite que consiste de (CA)<sub>17</sub> inmediatamente precedido por (CT)<sub>13</sub>, describiéndose la existencia de once alelos con 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215 y 217 pb (Pages et al., 1993). En este estudio se incluye la diferenciación genealógica de casos Simplex, Múltiple y sus respectivos familiares, todos los cuales son comparados por separado con un grupo control, además de incluir la diferenciación de sexos, al igual como lo hiciera Blanco et al., (1998b) para MSX1, dada la relación ya citada con EDN1. Por lo tanto, se espera, como anteriormente se expresa, una asociación significativa de FL(P) no sindrómica con EDN1.

**Tabla 1 Modos de Herencia propuestos para FL(P) no sindrómica**

MODO DE HERENCIA	AÑO	POBLACION	REFERENCIA
Monogénico	1942	Dinamarca	Fogh Andersen
	1991	Chile	Palomino et al.
Multifactorial con umbral de expresion	1969	U.K.	Carter CO.
	1970	U.K.	Fraser
	1971	U.S.A.	Bixler et al
	1976	Inglaterra	Carter CO.
	1980	Inglaterra	Fraser
	1982	Inglaterra	Carter et al.
	1984	China	Hu ND et al.
Gen mayor (mas componente multifactorial)	1986	Inglaterra	Marazita et al.
	1986	Dinamarca	Chung et al.
	1992	U.S.A., Inglaterra, Dinamarca	Mitchell et al.
Modelo Oligogénico	1992	Dinamarca, U.S.A., Francia, Inglaterra	Farral et al.
Gen Mayor o Herencia Multifactorial o Múltiples Loci interactuantes	1992	U.S.A., Inglaterra, Dinamarca, Canada	Mitchell et al.

**Tabla 2 Resumen de estudios de asociación y ligamiento entre genes candidatos FL(P) no sindrómica en el período 1989-1997**

**“ESTUDIO DE ASOCIACION ENTRE UN MICROSATELITE DEL GEN EDN 1, UBICADO EN EL CROMOSOMA 6, Y LA FISURA IABIOPALATINA NO SINDROMICA EN UNA POBLACION**

	<b>Locus</b>	<b>Localización</b>	<b>Asociación</b>	<b>Ligamiento</b>	<b>Investigadores</b>
1	GRL	5q11.13	(-)		Ardinger et al., 1989
2	ER	6q24.27	(-)		Ardinger et al., 1989
3	EGF	4q25.27	(-)		Ardinger et al., 1989
4	EGFR	7p13.12	(-)		Ardinger et al., 1989
5	TGFA	2p13	(+)		Ardinger et al., 1989
	TGFA			(-)	Hecht et al., 1991
	TGFA		(+)		Stoll et al., 1992
	TGFA		(+)		Holder et al., 1992
	TGFA			(-)	Vintiner et al., 1992
	TGFA		(+)		Chenevix-Trench et al., 1992
	TGFA		(+)		Sassani et al., 1993
	TGFA		(+)		Jara et al., 1995
6	EN2	7q36	(-)		Chenevix-Trench et al., 1992
7	HOX2F	17q21-22	(-)		Chenevix-Trench et al., 1992
8	HOX2G	17q21-22	(-)		Chenevix-Trench et al., 1992
9	BCL2	18q21.3	(-)		Chenevix-Trench et al., 1992
10	RARA	17q21.1	(+)		Chenevix-Trench et al., 1992
	RARA		(-)	(-)	Vintiner et al., 1993
	RARA			(-)	Stein et al., 1995
11	D17S579	17q21	(+)	(-)	Schaw et al., 1993
12	TCTE	6p		(-)	Hecht et al., 1993
13	D6S105	6p		(-)	Hecht et al., 1993
14	D6S89	6p23		(-)	Hecht et al., 1993
	D6S89			(+)	Carinci et al., 1995
15	F13A	6p25.24		(-)	Carinci et al., 1995
	F13A			(-)	Hecht et al., 1993
16	VIM	10p13	(-)	(-)	Hecht et al., 1993
17	CRTL1	5q15-14		(-)	Vintiner et al., 1993
18	D4S175	4q		(+)	Beiraghi et al., 1994
19	D4S192	4q		(+)	Beiraghi et al., 1994
20	D4S175	4q	(+)		Mitchell le 1994
21	D4S192	4q	(+)		Mitchell le 1994
22	TGFA	2p13	(+)		Feng et al., 1994
23	EDN1			(-)	Carinci et al., 1995
24	D6S109			(+)	Carinci et al., 1995
25	YAC	6p24.3	(+)		Davies et al., 1995
26	ABL1	9q34.1		(-)	Stein et al., 1995
27	BCL3	19q13.1		(+)	Stein et al., 1995

28	CMYC	8q24.12		(-)	Stein et al., 1995
29	EGF	4q25		(-)	Stein et al., 1995
30	EGFR	7p12		(-)	Stein et al., 1995
31	FGFA	5q31-32		(-)	Stein et al., 1995
32	GABRB3	15q11.2-q12		(-)	Stein et al., 1995
33	HRAS	11p		(-)	Stein et al., 1995
34	IGF2	11p		(-)	Stein et al., 1995
35	TGFB1	19q13.1		(-)	Stein et al., 1995
36	TGFB2	1q41		(-)	Stein et al., 1995
37	COL2A1	12q12-q13.2		(-)	Stein et al., 1995
38	COL9A1	16q		(-)	Stein et al., 1995
39	COL11A1	1p21		(-)	Stein et al., 1995
40	COL11A2	6p21.2		(-)	Stein et al., 1995
41	CRTL1	5q13-q14		(-)	Stein et al., 1995
42	CRTM	1p35		(-)	Stein et al., 1995
43	HXB	9q32-34		(-)	Stein et al., 1995
44	HOX2B	17q21-2		(-)	Stein et al., 1995
45	MSX1 (HOX7)	4p16.1-16.3		(-)	Stein et al., 1995
46	MSX2 (HOX8)	5q35		(-)	Stein et al., 1995
47	F13A	6p25.24		(-)	Blanton et al., 1996
48	D6S89	6p23		(-)	Blanton et al., 1996
49	D6S105	6p		(-)	Blanton et al., 1996
50	D4S175	4q		(-)	Blanton et al., 1996
51	D4S192	4q		(-)	Blanton et al., 1996



# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe relación entre algún alelo del marcador microsatélite del gen EDN1 y la presencia de FL(P) no sindrómica confrontando por separado las frecuencias alélicas de fisurados y sus familiares, tanto múltiplex como simplex, con las frecuencias de los controles.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

Calcular las frecuencias alélicas del marcador de EDN1 en fisurados Simplex y Fisurados Múltiplex, para la población total y para cada sexo.

Calcular las frecuencias alélicas del marcador de EDN1 en familiares Simples y familiares Múltiplex, para la población total y para cada sexo. 1.

Calcular las frecuencias alélicas del marcador de EDN1 en el grupo control, para la población total y para cada sexo. 2.

Calcular los valores de  $\chi^2$  para las comparaciones entre frecuencias alélicas del marcador de EDN1 en pacientes con FL(P) no sindrómica, en sus familiares sanos y en el grupo control. 3.

Calcular los valores de  $\chi^2$  para las comparaciones entre frecuencias alélicas del marcador de EDN1 en pacientes con FL(P) no sindrómica, en sus familiares sanos y el grupo control para cada sexo. 4.



# HIPOTESIS

"Existe asociación entre el marcador del gen EDN1 y la fisura labiopalatina no  
sindrómica".



## MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron muestras de DNA genómico extraídas de linfocitos en sangre periférica (Sambrook, 1989), provenientes de fisurados y sus familiares pertenecientes a la Fundación “Dr. Alfredo Gantz Mann”, del Servicio de Fisurados y Malformaciones del Departamento de Traumatología y Prótesis Maxilofaciales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, y del Centro de Amigos del Niño Fisurado de Talca (CEAMFI-Talca). Las muestras de sangre de los controles se obtuvieron de donantes del Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile “Dr. José Joaquín Aguirre”, los cuales corresponden a individuos sin antecedentes familiares de FL(P).

Para estudiar el gen EDN1 se utilizaron:

Cuarenta y dos pacientes con FL(P) no sindrómica, provenientes de familias múltiplex1. (FL(P)Mx).

Treinta y dos pacientes con FL(P) no sindrómica provenientes de familias simplex 2. (FL(P)Sx).

Sesenta familiares no afectados de pacientes con FL(P) no sindrómica, provenientes 3. de familias múltiplex (FFL(P)Mx).

Sesenta y dos familiares no afectados de pacientes con FL(P) no sindrómica, 4. provenientes de familias simplex (FFL(P)Sx).

Noventa y siete controles. 5.

El protocolo de extracción de DNA utilizado consiste en obtener 10 ml de sangre

periférica con EDTA como anticoagulante, separar el plasma por centrifugación, agregar una solución de lisis (sacarosa 0,32M, MgCl 5mM, Tris-HCl 5mM, Tritón X-100 1%), por 20 minutos, centrifugar y descartar el sobrenadante. Luego se resuspende el pellet en una solución de separación de DNA (Tris-HCl 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM) más una solución de proteinasa K y SDS 20%, para desproteización, para lo cual se incuba a 50°C ON. Luego se agrega NaCl 6M, se centrifuga y se transfiere el sobrenadante con cuidado a un tubo limpio. Para precipitar el DNA se agrega etanol al 95% y se agita hasta la aparición de una "medusa" que corresponde al DNA, la cual se toma y se resuspende en agua bidestilada estéril a 37°C ON.

Se amplificó, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el marcador del gen EDN1. Se utilizó un volumen de reacción de 25  $\mu$ l conteniendo 40 ng de DNA genómico, 18,5 pmoles de cada partidor (primer), cuyas secuencias se describen más adelante, 250  $\mu$ M de dNTP (mezcla en proporciones iguales de dATP, dGTP, dTTP y dCTP); 1% de formamida, 2,5  $\mu$ l de Buffer 10X (Promega) y 2U de Taq polimerasa (Promega). La reacción de amplificación se realizó en 30 ciclos, cada uno formado por 60 segundos de denaturación a 94°C; 60 segundos de alineamiento a 60°C y finalmente 30 segundos de extensión a 72°C.

Las secuencias nucleotídicas de los primers a utilizar son:

- 1) 5'-GATGGACAGAGAAGGCAGGTG-3' (cadena CA, CT). 1.
- 2) 5'-TGAATTTGCAAGACGTGTGC-3' (cadena GA, GT). 2.

Los productos obtenidos del PCR fueron visualizados en geles denaturantes de poliacrilamida al 5% con Buffer TBE 1X (89 mM tris, 89 mM ácido bórico, 1.2 mM de EDTA, pH 8.0), que se corrieron a 100 Watt por 40 minutos y revelados posteriormente con tinción de plata (Sambrook et al., 1989). En los geles se utilizaron pBR322Hae y Ladder 30-330 pb como marcadores de tamaño de los amplificados.

La tinción de plata utilizada consistió en fijar el gel en etanol al 10% por 10 minutos en agitación continua a temperatura ambiente. Luego de retirar el etanol se añade ácido nítrico al 1%, y se agita por tres minutos, para después lavar con agua destilada y añadir una solución de nitrato de plata al 0.2% p/v, que se agita por 15 minutos. Se vuelve a lavar con agua destilada y se revela con una solución de carbonato de sodio 2.9% y formaldehído 0.02%. En agitación continua se espera a que aparezcan las bandas de producto de DNA amplificado, y se retira la solución de revelado cuando se logra el contraste deseado, agregando ácido acético al 10% para detener la reacción.

Para el análisis estadístico de las frecuencias alélicas de EDN1, se utilizó la prueba de  $\chi^2$ , en lo que se refiere a los resultados de fisurados y sus familiares no afectados versus los controles. Para este fin se usará el programa computacional Jicualog ( $\chi^2$  log ratio) para el análisis total de los diferentes grupos, y el programa computacional EPI6 (tablas de contingencia 2x2) para el análisis alelo por alelo.

---

## RESULTADOS

En el proyecto inicial presentado para este trabajo de investigación, se propuso estudiar la asociación entre un microsatélite del gen EDN1 y la FL(P) no sindrómica, trabajando con un grupo de 30 fisurados múltiplex, 30 fisurados simplex, 60 familiares múltiplex, 60 familiares simplex y 70 controles, y los objetivos consistían en el cálculo de las frecuencias alélicas para cada grupo y el análisis estadístico confrontando a cada grupo por separado con los controles para percibir diferencias entre ellos. En este informe final, se mantienen los objetivos propuestos, agregándose la diferenciación por sexo de cada población en estudio y se realizó el análisis descrito para hombres y mujeres por separado en cada grupo. Además se estudiaron, en definitiva, 42 fisurados múltiplex, 32 fisurados simplex, 60 familiares múltiplex, 62 familiares simplex y 97 controles.

Al observar las lecturas de los geles, destaca la aparición de bandas correspondientes a un alelo de 195 pb, no descrito en la población caucásica estudiada por Pages et al., en 1993. También, en comparación a los alelos registrados en caucásicos, en nuestra población control (que consideramos como la población chilena para efectos de este estudio), no aparecen lecturas correspondientes al alelo de 217 pb. Dichas lecturas se realizaron en base a parámetros establecidos, como marcadores de peso molecular, en este caso el pBR322Hae y algunos marcadores internos, de tamaños confirmados, que esta vez correspondieron a amplificadores de D6S109. Además se realizaron electroforesis hasta obtener lecturas iguales, de cada muestra de controles, fisurados y sus familiares, en dos geles diferentes. Con estas observaciones, es decir con la aparición de un alelo 195 y sin lecturas de 217, se sospechó en un principio en un desplazamiento de las lecturas, hecho que alteraría todos los análisis realizados. Para

confirmar o descartar este hecho, se utilizaron muestras al azar de amplificadas de EDN1 y se corrieron en un gel de poliacrilamida en las mismas condiciones establecidas para este estudio, con la diferencia que el marcador de tamaño utilizado fue un DNA Ladder con bandas de diez en diez pb (rango de 330 a 30 pb). Con ello se observó que las lecturas realizadas eran correctas.

El primer análisis realizado, para el marcador en estudio del gen EDN1, fue el cálculo de las frecuencias alélicas de los controles, del cual lo primero que se desprende es la diferencia entre los alelos mayormente encontrados en la población chilena, 199 y 197 (0,433 y 0,247 respectivamente), y los mas comunes en caucásicos, correspondiendo a los alelos 201 y 203 (0,37 y 0,21 respectivamente). Ver tabla N°3.

En el análisis estadístico, al enfrentar los hallazgos de nuestros controles con lo registrado por Pages et al., existe una diferencia altamente significativa para la comparación total de las poblaciones ( $\chi^2 = 118,5$ ;  $p < 10^{-7}$ ). Al comparar las frecuencias alelo por alelo, se registran diferencias significativas para los alelos 197, 199, 201, 203, 205 y 207 ( $\chi^2$  y p-values en tabla N°9).

La tabla N°4 muestra las frecuencias de aparición (en porcentaje) de los diferentes alelos de EDN1, registradas en los individuos fisurados totales y en el total de sus familiares no afectados, en donde la tendencia de mayor frecuencia se mantiene en los alelos 197 y 199 para ambos grupos en estudio. Al comparar cada población descrita anteriormente, es decir, fisurados totales y familiares totales, con lo registrado para los controles, no se encontraron diferencias significativas para el análisis total en ningún grupo (tablas N°10 y N°11). En la confrontación de fisurados totales con los controles, alelo por alelo, los resultados no arrojaron diferencias significativas para ningún alelo (cuadro resumen N°1). En el caso de los familiares totales, sólo aparece significancia para el alelo 201 ( $\chi^2 = 9,37$ ;  $p = 0,0022$ ).

La tabla N°5 muestra las frecuencias porcentuales de los alelos de EDN1 para controles, fisurados totales y familiares totales según sexo, la cual registra que en los controles, para ambos sexos, las mayores frecuencias las presentan los alelos 197 y 199, hecho que también ocurre en los fisurados totales para ambos sexos. En los familiares totales varones, los alelos 197, 199 y 201 son los más frecuentes, mientras que en los familiares totales mujeres, los alelos con mayor frecuencia son 197 y 201.

Las tablas N°6, N°7 y N°8 muestran las frecuencias porcentuales de los alelos de EDN1, respectivamente para: fisurados simplex y múltiple, familiares simplex y múltiple y las frecuencias para los mismos grupos mencionados según sexo. Aquí se mantiene la tendencia hacia mayores frecuencias de los alelos 197, 199 y 201 (ver frecuencias en tablas N°6, N°7 y N°8).

En el análisis estadístico, en la tabla N°10 aparecen los  $\chi^2$  totales de las diversas comparaciones entre los individuos fisurados y los controles, es decir como población total, clasificados en simplex y múltiple, y diferenciados por sexo para cada grupo. En ninguna de las comparaciones se observó diferencia estadísticamente significativa. Sólo en el análisis alelo por alelo, para las mismas combinatorias de comparación, aparece significancia para el alelo 209 en los fisurados múltiple totales versus controles, con valores que bordean la significancia ( $\chi^2 = 4,36$ ;  $p = 0,0367$ ; prueba de Fisher 1-t =

0,04584). Esta diferencia para el alelo 209, también aparece en los fisurados múltiplex varones versus controles varones, aumentando levemente la significancia ( $\chi^2 = 5,26$ ;  $p = 0,0218$ ; prueba de Fisher 1-t =0,04144). En los fisurados múltiplex mujeres versus controles mujeres no aparece la diferencia para el alelo 209 (ver cuadro resumen N°1).

Al realizar el mismo análisis estadístico descrito en el párrafo anterior, pero para los familiares no afectados de fisurados versus los controles, se observó, como muestra la tabla N°11, que existe una diferencia significativa entre los familiares múltiplex totales y controles totales ( $\chi^2 = 22,842$ ;  $p = 0,0186$ ). Al hacer la diferenciación por sexo, esta diferencia sólo se mantiene en los familiares múltiplex varones versus controles varones aumentando la significancia ( $\chi^2 = 28,644$ ;  $p = 0,00258$ ). Esta diferencia no apareció al confrontar familiares múltiplex mujeres con controles mujeres. Para efectos de confirmación se compararon los familiares múltiplex hombres con los familiares múltiplex mujeres, lo que mostró que son dos poblaciones significativamente diferentes ( $\chi^2 = 20,77$ ;  $p = 0,03582$ ).

El cuadro N°2 resume el análisis, alelo por alelo, de las diferentes combinatorias entre los familiares estudiados y los controles, del cual destacan:

Familiares totales /Controles totales: alelo 201( $\chi^2 = 9,37$ ; $p = 0,0022$ ).
Familiares simplex totales /Controles totales: alelo 201( $\chi^2 = 3,87$ ; $p = 0,0497$ ).
Familiares múltiplex totales /Controles totales: alelo 201( $\chi^2 = 11,52$ ; $p = 0,00068$ ).
Familiares totales varones /Controles varones: alelo 201( $\chi^2 = 5,06$ ; $p = 0,0244$ ).
Familiares simplex mujeres /Controles mujeres: alelo 199( $\chi^2 = 3,96$ ; $p = 0,0466$ ): alelo 201( $\chi^2 = 7,19$ ; $p = 0,0073$ ).
Familiares múltiplex varones /Controles varones: alelo 197( $\chi^2 = 3,94$ ; $p = 0,0472$ ) alelo 201( $\chi^2 = 16,87$ ; $p = 3,99 \times 10^{-5}$ ).

En síntesis, podemos decir que los fisurados no son diferentes de los controles, salvo para el alelo 209, como es el caso de los fisurados múltiplex totales y los fisurados múltiplex varones. La diferencia aparece en los familiares múltiplex totales y familiares múltiplex varones, y en el análisis alelo por alelo, destaca la presencia del alelo 201, como marcador para la gran mayoría de los familiares en estudio, tal como lo muestra el cuadro resumen N°2.

**Tabla N°3 FRECUENCIAS (%) DE LOS ALELOS DE EDN1 PARA CAUCASICOS Y PARA UNA POBLACION CHILENA.**

**“ESTUDIO DE ASOCIACION ENTRE UN MICROSATELITE DEL GEN EDN 1, UBICADO EN EL CROMOSOMA 6, Y LA FISURA IABIOPALATINA NO SINDROMICA EN UNA POBLACION**

Alelo	Caucásicos (Pages et al. )	Pob. Chilena (Presente estudio)
195	No descrito.	0,0
197	1,0	24,7
199	8,0	43,3
201	37,0	8,3
203	21,0	8,3
205	12,0	4,6
207	11,0	4,6
209	2,0	2,1
211	2,0	3,1
213	1,0	0,0
215	2,0	0,5
217	2,0	0,0

**Tabla N°4 FRECUENCIA (%) DE LOS ALELOS DE EDN1 PARA FISURADOS TOTALES Y FAMILIARES TOTALES.**

Alelo	Fisurados totales (N=74)	Familiares totales (N=122)
195	0,0	1,23
197	16,67	20,49
199	46,67	36,07
201	10,0	18,44
203	10,67	7,38
205	4,0	2,46
207	3,33	6,56
209	5,33	2,87
211	2,67	2,87
213	0,67	0,82
215	0,0	0,82
217	0,0	0,0

**Tabla N°5 FRECUENCIA (%) DE LOS ALELOS DE EDN1 PARA CONTROLES, FISURADOS TOTALES Y FAMILIARES TOTALES SEGÚN SEXO.**



## RESULTADOS

Alelo	Control Hombres (N=59)	Control Mujeres (N=38)	Fis. Total Hombres (N=43)	Fis. Total Mujeres (N=31)	Fam. Total Hombres (N=50)	Fam. Total Mujeres (N=31)
195	0,85	0,0	0,0	0,0	1,0	1,3
197	22,88	27,63	16,28	16,13	20,0	20,0
199	39,83	48,68	45,35	48,39	20,0	37,1
201	9,32	6,58	11,63	8,06	34,0	17,1
203	11,02	3,95	10,47	11,29	9,0	6,1
205	4,24	5,26	3,49	4,84	9,1	3,4
207	5,93	2,63	3,49	3,23	7,0	6,1
209	1,69	2,63	6,98	3,23	3,0	2,7
211	3,39	2,63	2,33	3,23	3,0	2,7
213	0,0	0,0	0,0	1,61	2,0	0,0
215	0,85	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3
217	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Alelo	Fisurados Sx (N=32)	Fisurados Mx (N=42)	Familiares Sx (N=62)	Familiares Mx (N=62)
195	0,0	0,0	0,0	2,5
197	18,18	15,48	24,19	16,67
199	39,39	52,38	36,29	35,83
201	13,64	7,14	15,32	21,67
203	7,58	13,1	5,65	9,17
205	6,06	2,38	3,23	1,67
207	6,06	1,19	6,45	6,67
209	3,03	7,14	3,23	2,5
211	4,55	1,19	4,84	0,83
213	1,52	0,0	0,81	0,83
215	0,0	0,0	0,0	1,67
217	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabla N°7 FRECUENCIA (%) DE LOS ALELOS DE EDN1 PARA FISURADOS SIMPLEX (Sx) Y MULTIPLEX (Mx) SEGÚN SEXO.**

**“ESTUDIO DE ASOCIACION ENTRE UN MICROSATELITE DEL GEN EDN 1, UBICADO EN EL CROMOSOMA 6, Y LA FISURA IABIOPALATINA NO SINDROMICA EN UNA POBLACION**

Alelo	Fis Sx Hombres (N=22)	Fis Sx Mujeres (N=10)	Fis Mx Hombres (N=21)	Fis Mx Mujeres (N=)
195	0,0	0,0	0,0	0,0
197	15,9	20,0	16,67	14,29
199	38,64	40,0	52,38	52,38
201	15,91	10,0	7,14	7,14
203	6,82	10,0	14,29	11,9
205	6,82	5,0	0,0	4,76
207	6,82	5,0	0,0	2,38
209	4,55	0,0	9,52	4,76
211	4,55	5,0	0,0	2,38
213	0,0	5,0	0,0	0,0
215	0,0	0,0	0,0	0,0
217	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabla N°8 FRECUENCIA (%) DE LOS ALELOS DE EDN1 PARA LOS FAMILIARES DE FISURADOS SIMPLEX (Sx) Y MULTIPLEX SEGÚN SEXO.**

Alelo	Fam Sx Hombres (N=28)	Fam Sx Mujeres (N=34)	Fam Mx Hombre (N=22)	Fam Mx Muj (N=38)
195	0,0	0,0	2,27	2,63
197	28,57	20,59	9,09	21,05
199	41,07	32,35	25,0	42,11
201	7,14	22,06	36,36	13,16
203	7,14	4,41	11,36	7,89
205	1,79	4,41	0,0	2,63
207	3,57	8,82	11,36	3,95
209	3,57	2,94	2,27	2,63
211	5,36	4,41	0,0	1,32
213	1,79	0,0	2,27	0,0
215	0,0	0,0	0,0	2,63
217	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabla N°9 CONTROLES VERSUS CAUCASICOS ( $\chi^2$  TOTAL Y ALELO POR ALELO).**

	$\chi^2$	P value
Total	118,4969	$P \leq 10^{-7}$
Alelo por alelo		
195	0,51	0,4742498
		0,66212 (1-t)
197	26,51	0,0000003
199	37,74	0,0000000
201	37,53	0,0000000
203	9,99	0,00158
205	5,52	0,01885
207	4,32	0,03773
209	0,00	0,981003
		0,67244 (1-t)
211	0,28	0,594128
		0,45553 (1-t)
213	1,97	0,160840
		0,33788 (1-t)
215	0,24	0,621299
		0,55936 (1-t)
217	3,95	0,046979
		0,11339 (1-t)

Tabla N°10 VALORES DE  $\chi^2$  TOTAL PARA LA COMPARACION DE FISURADOS VERSUS CONTROLES.

Comparación	$\chi^2$	P value
Fis Total /Control Total	11,1382	0,43176
Fis Sx/Control Total	7,9923	0,71399
Fis Mx/Control Total	14,2995	0,21686
Fis Total Hom/Control Hom	8,3739	0,67947
Fis Total Muj/Control Muj	6,4748	0,83988
Fis Sx Hom/Control Hom	5,3374	0,91373
Fis Sx Muj/Control Muj	6,4019	0,84525
Fis Mx Hom/Control Hom	17,3629	0,09759
Fis Mx Muj/Control Muj	5,11455	0,92549

Tabla N°11 VALORES DE  $\chi^2$  TOTAL PARA LA COMPARACION DE FAMILIARES DE FISURADOS VERSUS CONTROLES.

Comparación	$\chi^2$	P value
Familiar Total/Control Total	16,5462	0,12203
Fam Sx/Control Total	10,6994	0,46878
Fam Mx/Control Total	22,8419	0,01861
Fam Total Hom/Control Hombres	12,4508	0,33073
Fam Total Muj/Control Mujeres	12,9533	0,29638
Fam Sx Hom/Control Hombres	7,2273	0,78038
Fam Sx Muj/Control Mujeres	12,4907	0,32791
Fam Mx Hom/Control Hombres	28,6442	0,00258
Fam Mx Muj/Control Mujeres	10,5247	0,48389

## SIMBOLOGIA CUADROS RESUMEN

<b>X</b>	Significativo ( $p < 0,05$ )
<input type="checkbox"/>	No significativo ( $p > 0,05$ )
	No significativo ( $p \geq 0,05$ )

**CoT:** Control Total

**CoH :** Control Hombres.

**CoM :** Control Mujeres

**FT :** Fisurados Totales.

**FSx :** Fisurados Simplex totales.

**FMx :** Fisurados Multiplex totales

**FTH :** Fisurados Totales Hombres.

**FTM :** Fisurados Totales Mujeres.

**FSxH :** Fisurados Simplex Hombres.

**FSxM :** Fisurados Simplex Mujeres.

**FMxH :** Fisurados Multiplex Hombres.

**FMxM :** Fisurados Multiplex Mujeres.

**FaT :** Familiares Totales totales.

**FaSx :** Familiares Simplex totales.

**FaMx :** Familiares Multiplex totales.

**FaTH :** Familiares Totales Hombres.

**FaTM :** Familiares Totales Mujeres.

**FaSxH** : Familiares Simplex Hombres.

**FaSxM** : Familiares Simplex Mujeres.

**FaMxH** : Familiares Mutiplex Hombres.

**FaMxM** : Familiares Multiplex Mujeres.

Tabla N° 12: CUADRO RESUMEN N°1: SIGNIFICANCIA DE LA COMPARACION DE FISURADOS VERSUS CONTROLES PARA EDN1 ( $\chi^2$  TOTAL Y ALELO POR ALELO).

Alelo	FT/ CoT	FSx/ Co	FMx/ Co	FTH/ CoH	FTM/ CoM	FSxH/ Co	FSxM/ Co	FMxH/ Co	FMxM/ CoM
195									
197									
199									
201									
203									
205									
207									
209			x					x	
211									
213									
215									
217									
Total									

Tabla N° 13: CUADRO RESUMEN N°2: SIGNIFICANCIA DE LA COMPARACION DE FAMILIARES DE FISURADOS VERSUS CONTROLES PARA EDN1( $\chi^2$  TOTAL Y ALELO POR ALELO).

Alelo	FaT/ CoT	FaSx/ Co	FaMx/ Co	FaTH/ CoH	FaTM/ CoM	FaSxH/ Co	FaSxM/ Co	FaMxH/ Co	FaMxM/ CoM
195									
197								x	
199						x			
201	x	x	x	x	x		x	x	
203									
205									
207									
209									
211									
213									
215									
217									
Total			x					x	



## DISCUSION

Para este estudio se ha encontrado una diferencia significativa al comparar la frecuencia de todos los alelos de una muestra de la población chilena no afectada por fisura (representada por nuestros controles) con lo descrito para caucásicos. Esta gran diferencia es teóricamente esperable debido al distinto origen étnico de las poblaciones caucásicas respecto de los individuos de origen amerindio, como es el caso de los chilenos. Esto no sólo se demuestra para EDN1 en el análisis total ya descrito en los resultados, sino también en la observación de alelos propios para la población chilena, lo que ocurre con los alelos 197, 199, 201, 203, 205 y 207.

Si revisamos el trabajo de Palomino et al., de 1997, se puede observar la influencia de la mezcla indígena en la frecuencia de aparición de fisuras labiales y palatinas. Los autores muestran que a mayor nivel de mezcla indígena, como en la población del norte y sur de Chile, y en estratos socioeconómicos bajos de nuestra capital, aumenta la incidencia del fenómeno fisura. Este hecho se hace menos común cuando se estudian poblaciones con menor mezcla indígena y un origen caucásico más marcado, como en los estratos altos de nuestra sociedad capitalina. Esto permite confirmar las inferencias citadas en el párrafo anterior, estableciendo una diferencia étnica, y por lo tanto genética, entre poblaciones de origen amerindio y caucásico, al menos para la FL(P).

Durante varias décadas se ha buscado él o los genes responsables de la etiología de la FL(P) no sindrómica, por lo que se han postulado varios modelos de herencia (tabla N°1). Los estudios realizados para este efecto han arrojado resultados discordantes para un mismo locus en poblaciones étnicamente homogéneas. Por lo cuál, al menos en Chile,

se incluye la clasificación genealógica de familias Simplex y Múltiplex, que ya se ha comprobado que también corresponde a una diferencia genética (Blanco et al., 1998a). Estos estudios estarían apoyando una hipótesis de heterogeneidad genética, además del modelo oligogénico, en donde la aparición del fenómeno fisura dependería de la expresión conjunta de varios loci, sin que ninguno de ellos se lleve el peso de la ocurrencia de dicha malformación. También estas observaciones permiten explicar los contradictorios y generalmente negativos análisis de ligamiento, que tratan de demostrar el modelo del gen mayor en la etiología de la FL(P) no sindrómica.

Al observar los análisis estadísticos de los familiares no afectados de fisurados versus la población control, aparecen, en contraste con lo acontecido para los individuos fisurados, diferencias significativas en la comparación de los diversos grupos con los controles (análisis total) y además en las confrontaciones alelo por alelo. Primero, la significancia de los familiares múltiplex totales, que luego se mantiene sólo en los familiares múltiplex varones y no así en los familiares múltiplex mujeres. Segundo, al estudiar la confrontación entre familiares múltiplex varones versus familiares múltiplex mujeres, se observa que existe una diferencia significativa entre sexos, al menos para este grupo de familiares. Esto confirmaría que existe un dimorfismo sexual para EDN1 y que la clasificación de simplex y múltiplex no es una mera observación genealógica, sino también una disimilitud etiológica. Tercero, y último punto en lo que a familiares se refiere, es la marcada aparición del alelo 201, que como se observa en el cuadro resumen N°2, se presenta como un alelo propio de los familiares tanto simplex como múltiplex, y en algunos casos para varones y mujeres.

En el panorama global, podemos aseverar que, para EDN1, los individuos afectados por la FL(P) no sindrómica son diferentes a sus propios familiares sanos, que a su vez son diferentes a los controles (al menos en familiares múltiplex), hecho no observado en los fisurados. Esto sugiere que la influencia de EDN1 en la aparición del rasgo fisura no dependería de este gen en forma aislada, sino de la expresión conjunta de este último con otros genes, ya que sería la única forma de explicar el porqué sólo los familiares son diferentes a los controles y a su vez estar sanos. Con estas inferencias se apoyaría la hipótesis de heterogeneidad genética o interacción genética compleja, que explicaría la aparición de familias simplex y múltiplex, para lo cual se verían involucrados varios loci, sin que ninguno tuviese el peso mayor. Esto es lo que postula el modelo oligogénico y descarta el modelo del gen mayor. La deducción antes citada se hace más lógica si se observa que cualquier alteración producida en los procesos embriológicos de la formación del labio y el paladar, puede llevar a la aparición de FL(P), procesos en los cuales participan una serie de diferentes genes, generalmente en interacción, lo que llevaría a pensar que existen múltiples formas de llegar a ser fisurado.

El dimorfismo sexual encontrado, al menos en el grupo significativamente diferente, también sustenta la necesidad de la expresión de otros genes en la aparición de la malformación cráneo facial en estudio. Esta diferencia entre varones y mujeres para EDN1 probablemente se deba a que este gen se expresaría, al menos en su participación en procesos embriológicos, en etapas posteriores a la acción de genes que dependen de la diferenciación sexual del individuo en desarrollo, lo que también ocurriría con MSX1, donde ambos genes participan en una cascada metabólica común (Thomas et al., 1998).



Por lo expresado en los párrafos anteriores, a futuro sería interesante observar y analizar la influencia de EDN1 en forma conjunta con otros genes, cercanos posicionalmente en 6p, como D6S105 y D6S89, o con genes que participan en las mismas vías metabólicas u ontogenéticas, como MSX1 o como el TGF $\alpha$ .

#### CONCLUSIONES

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Ardinger HH., Burton KH., Bell GL., Bardock J., Van Demark DR., Murray JC. "Association of genetic variation of the transforming growth factor alpha gene with cleft lip and palate". *Am. J. Hum. Genet.* (1989) 45: 348-353.
- 2) Beiraghi S., Foroud T., Diouhy S., Bixler D., Conneally PM., Delozier-Blanchet D., Hodes MS. "Possible localization of a major gene for the cleft lip and palate to 4q". *Clin. Genet.* (1994) 46: 255-256.
- 3) Berge KE., Berg K. "No effect of a Taq1 polymorphism in DNA at the endothelin I (EDN1) locus on normal blood pressure level or variability". *Clin. Genet.* (1992) 41: 90-95.
- 4) Blanco R., Jara L., Villaseca C. "Asociación entre la variación genética de MSX1 (Hox-7) y la fisura labiopalatina no sindrómica en una población chilena". *Rev. Med. Chile.* (1998) 126: 637-645. (a)
- 5) Blanco R., Jara L., Villaseca C., Palomino C., Carreño H. "La variación genética de MSX1 presenta un dimorfismo sexual en la fisura labiopalatina no sindrómica en la población chilena". *Rev. Med Chile.* (1998) 126: 781-787. (b)
- 6) Blanton SH., Crowder E., Malcom S., Winter R., Gasser DK., Stal S., Mulliken J. And Hecht JJ. "Exclusion of linkage between cleft lip with or without cleft palate and markers on chromosomes 4 and 6". *Am. J. Hum. Genet* (1996) 58: 239-241.
- 7) Carinci F., Pezzett F., Scapoli L., Padula E., Baciliero U., Curioni C. And Tognon M. "Non syndromic cleft lip and palate: Evidence of linkage to a microsatellite marker on 6p23". *Am. J. Hum. Genet* (1995) 56: 337-339.
- 8) Carreño H., Paredes M., Palomino H., Jara L. Y Blanco R. "Asociación de la fisura labiopalatina no sindrómica (FLPNS) con cuatro marcadores genético-moleculares". Programa y resúmenes de Comunicaciones, XXXI Reunión Anual Sociedad de Genética de Chile. Octubre 1998.
- 9) Carter CO. "Genetics of common disorders". *Br. Med. Bull* (1969) 19: 246-261.
- 10) Carter CO., Evans K., Coffery R., Fraser-Roberts JA., Buck A. And Fraser-Roberts M. "A three generation family study of cleft lip with or without cleft palate". *J. Med. Genet* (1982) 19: 246-261.
- 11) Chenevix-Trench G., Jones K., Green A. and Martin NG. "Further evidence for an association between genetic variation in Transforming Growth Factor Alpha and Cleft Lip and Palate". *Am. J. Hum. Genet.* (1991) 48: 1012-1013.
- 12) Chenevix-Trench G., Jones K., Green A., Duffy DL. and Martin NG. "Cleft lip with or without cleft palate : Associations with Transforming Growth Factor Alpha and Retinoic Acid Receptor Loci". *Am. J. Hum. Genet.* (1992) 51: 1377-1385.
- 13) Chung CS. "Segregation analysis of cleft lip with or without cleft palate: a

- comparison of Danish and Japanese data”. *Am. J. Hum. Genet.* (1986) 39: 603-611.
- 14) Davies AF., Stephens RJ., Olavesen MG., Heather L., Dixon MJ., Magge A., Flinter F and Ragoussis J. “Evidence of a locus for orofacial clefting on human chromosome 6p24 and STS content map of the region”. *Hum. Mol. Genet.* (1995) 4: 121-128.
- 15) Farral M. And Holder S. “Familial Recurrence-Pattern Analysis of Clrft Lip with or without Cleft Palate”. *Am. J. Hum. Genet* (1992) 50: 270-277.
- 16) Feng h., Sassani R., Bartlett S., Lu A., Hecht J., Malcom S., Winter R., Vuntiner GM., Buetow D. And Gasser D. “Evidence from Family Studies for Linkage Disequilibrium between TGFA and Gene for Nonsyndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate”. *Am. J. Med. Genet.* (1994) 31: 425.
- 17) Fraser FC. “Genetics of cleft lip and palate”. *Am. J. Hum. Genet.* (1970) 22: 336-352.
- 18) Gorlin RJ. “Sindromes of the head and neck” Oxford University Press (1990).
- 19) Hecht JT., Wang Y., Blanton sh., Michels VV. And Daiger SP. “Cleft Lip and Palate: No evidence of linkage to Transforming Growth Factor Alpha”. *Am. J. Hum. Genet.*(1991) 49:682-686.
- 20) Hecht JT., Wang Y., Connor B., Blanton SH. And Daiger SP. “Nonsyndromic cleft lip and palate: No evidence of linkage to HLA or factor 13”. *Am. J. Hum. Genet.* (1993) 52: 1230-1233.
- 21) Hoehe MR., Ehrenreich H., Otterrud B., Caneazzo L., Plaetke R., Zander H. And Leppert M. “The human Endothelin-1 gene (EDN1) encoding a peptide wiyh potent vasoactive properties maps distal to HLA on chromosome arm 6p in close linkage to D6S89”. *Citogenetic Cell Genet.* (1993) 62: 131-135.
- 22) Holder SE., Vintiner GM., Farren B., Malcom S., Winter RM. "Confirmation of association between RFLP's at teh transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate". *J. Med. Genet.* (1992) 29: 390-392.
- 23) Hu ND., Li JH., Chen HI., Chang HS., Wu BX., Lu ZK., Wang DZ. And Liu XG. "Gentics of cleft lip and palte in China". *Am. J. Hum. Genet.* (1982) 34: 999-1002.
- 24) Kojima M.,Ohata K., Yasue H. "Structural organization and chromosomal assignment of the swine endothelin-1 gene". *J. Vet. Med. Sci.* (1997) 45: 431-435.
- 25) Marazita ML., Golkstein AM., Smalley SL. And Spence MA. "Cleft lip with or withuot cleft palate: reanalysis of a three generation family study from England". *Genetic Epidemiology.* (1986) 3: 335-342.
- 26) Meneghello RJ. "Pediatria". Quinta edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. (1997).
- 27) Mitchell LE. and Risch N. "Mode of unheritance of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: a reanalysis". *Am. J. Hum. Genet.* (1992) 52: 323-332.
- 28) Mitchell LE. "Interpreting the evidence for an association between the retinoic acid receptor locus and non syndromic cleft lip with or without cleft palate".*Am. J. Med. Genet.* (1994) 31:425.
- 29) Mitchell LE., Healy SC. And Chenevix-Trench G. "Evidence for an association between non syndromic cleft lip with or without cleft palate and a gene located on the long arm of the chromosome 4". *Am. J. Med. Genet.* (1995) 57: 1130-1136.

- 
- 30) Moore K., Persaud T. "Embriología Clínica". Quinta Edición, Editorial Interamericana, Mexico D. F. (1997).
- 31) Morita H., Kurihara H., Kurihara Y., Kuwaki T., Shindo T., Oh-hashii Y., Kumada M., and Yazaki Y. "Responses of blood pressure and catecholamine metabolism to high salt loading in endothelin-1 knockout mice". *Hipertens. Res.* (1999) 22: 11-16.
- 32) Nazer J., Cifuentes L., Meza M. "Incidencia de malformaciones congénitas en 10 maternidades chilenas participantes en el ECLAMC. Comparación de tres períodos (1971-1977, 1982-1988, 1989-1994)". *Rev. Med. Chile.* (1997) 125: 993-1001.
- 33) Pages JC., Drieu C., Blanché H., Beckman J. and Cann HM. "A short tandem repeat polymorphism at the endothelin 1 (EDN1) locus". *Hum. Molec. Genet.* (1993) 2: 90.
- 34) Palomino H. Li SC., Palomino HM., Burton SA. and Chakraborty R. "Complex segregation analysis of facial clefting in Chile". *Am. J. Hum. Genet.* (1991) 49: 154.
- 35) Palomino HM., Palomino H., Cauri D., Barton S. and Chakraborty R. "Facial Clefting and Admixture in Population of Santiago, Chile". *Am. J. Hum. Biology.* (1997) 9: 225-232.
- 36) Passarge E. "Color Atlas of Genetics". Primera Edición, Thieme Medical Publishers, Stuttgart. (1995).
- 37) Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).
- 38) Sasani R., Barlett SP., Feng H., Goldner-Sauve A., Haq AH., Buetow KH. and Gasser DL. "Association between alleles of the Transforming Growth Factor -Alpha locus and the occurrence of cleft lip". *Am. J. Med. Genet.* (1993) 45: 565-569.
- 39) Shaw D., Ray A., Marazita M. and Field L. "Further evidence of a relationship between the retinoic acid receptor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate". *Am. J. Hum. Genet.* (1993) 53:1156-1157.
- 40) Stein J., Mulliken JB., Stal S., Gasser DL., Malcolm S., Winter R., Blanton SH., Amos C., Sumanova E. and Hecht JT. "Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: evidence of linkage to BCL-3 in 17 multigeneration families" *Am. J. Hum. Genet.* (1995) 57:257-272.
- 41) Stoll C., Qian JF., Fiengold J., Suavege P. and May E. "Genetic variation in Transforming Growth Factor Alpha.: Possible Association of BamH1 Polymorphism with Bilateral Sporadic Cleft Lip and Palate" *Am. J. Hum. Genet* (1992) 50: 870-871.
- 42) Thomas T., Kurihara H., Yanagishi H., Kurihara Y., Yazak Y., Olson N. and Srivastava D. "A signaling cascade involving endothelin-1, dHAND and msx 1 regulates development of neural-crest-derived branchial arch mesenchyme". *Development* (1998) 125: 3005-3014.
- 43) Vintiner GM., Hilder SE., Winter RM., Malcolm S. "No evidence of linkage between the transforming growth factor- alpha gene in families with apparently autosomal dominant inheritance of cleft lip and palate" *J. Med. Genet.* (1992) 29: 393-397.